

Untersuchungen zum Mechanismus und zur Struktur-Wirkungs- Beziehung der hypoglykämischen Wirkung von Fluorchinolonen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christine Gunda Kriete
aus Brake (Unterweser)

1. Referent: Professor Dr. med. I. Rustenbeck

2. Referent: Professor Dr. med. U. Panten

eingereicht am: 14.09.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am: 19.12.2007

Druckjahr: 2008

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in den folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Kriete, C. und I. Rustenbeck: Glucose-dependent effect of Fluoroquinolones on the cytosolic calcium concentration of mouse pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2004); Vol. 369, Suppl. 1; R 72, 286. 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

Kriete, C. und I. Rustenbeck: Fluoroquinolones increase the cytosolic calcium concentration in mouse pancreatic B-cells. Abstract 665, Page A-117. „World Conference on Magic Bullets“ in Nürnberg (2004).

Kriete, C., A. Pflöger, B.J. Zünkler, U. Holzgrabe und I. Rustenbeck: Insulinotropic properties of fluoroquinolones. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2005); Vol. 371, Suppl. 1; R 66, 278. 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

Kriete, C., A. Pflöger, B.J. Zünkler, U. Holzgrabe und I. Rustenbeck: Insulinotropic properties of fluoroquinolones. Fachtagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Mainz (2005).

Kriete, C., A. Pflöger, B.J. Zünkler, U. Holzgrabe and I. Rustenbeck: Different insulinotropic effects of fluoroquinolones. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* (2006); Vol. 372, Suppl. 1; R 69, 245. 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2003 bis September 2007 an dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Sehr viele Menschen haben an der Entstehung und dem Erfolg dieser Arbeit auf unterschiedlichen Ebenen einen wesentlichen Beitrag geleistet. Ihnen möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen. Sollte der Name nicht explizit erwähnt werden, so bedeutet dies nicht, dass ihrer Unterstützung eine geringere Wertschätzung zukommt.

Herrn Professor Dr. med. Ingo Rustenbeck danke ich sehr für die interessante Aufgabenstellung und die stets hilfreiche und freundliche Betreuung während der Arbeit. Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die Einführung in die experimentellen Methoden und die enge Zusammenarbeit, insbesondere Frau Verena Lier-Glaubitz, Frau Sabine Warmbold, Frau Ines Thompsen, Frau Petra Weber und den Mitarbeiterinnen aus der Zentralen Einrichtung für Tierhaltung. Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Lutz Preu von der Abteilung für pharmazeutische Chemie, Herrn Professor Dr. med. Panten und den Kollegen aus der Abteilung für pharmazeutische Technologie für die Nutzung des Spektrofluorimeters aussprechen. Für die gemeinsame Gestaltung des mikrobiologischen Kurses möchte ich mich herzlich bei Frau Caroline Ratunde, Frau Claudia Ott sowie Herrn Dr. vet. Vieregge bedanken. Frau Professor Dr. rer. nat. Ulrike Holzgrabe danke ich für die Zurverfügungstellung der congeneren Fluorchinolone C1 bis C4. Darüber hinaus möchte ich Herrn Klaus Hartmann aus der Chemikalienausgabe für die fachkundige Unterstützung bei Problemen mit der EDV-Software und -Hardware danken.

Meinen Eltern sowie meinen Freunden und den mir nahe stehenden Menschen möchte ich für die Hilfe und Ermutigung während dieser Arbeit ebenfalls besonders danken.

Inhaltsverzeichnis	I-VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII-XI
1. Einleitung	1-27
1.1 Die Fluorchinolone	1
1.1.1 Die Entwicklung der vier Fluorchinolone-Generationen	2
1.1.2 Der Wirkungsmechanismus der Fluorchinolone	6
1.1.3 Die Struktur-Wirkungs-Beziehung	9
a) <i>N1-Position</i>	11
b) <i>C3- und C4-Position</i>	12
c) <i>C6-Position</i>	13
d) <i>C7-Position</i>	13
e) <i>C8-Position</i>	14
f) <i>Chiralität der Fluorchinolone</i>	15
1.1.4 Spezifische Toxizität der Fluorchinolone	15
a) <i>Zytotoxische Eigenschaften</i>	16
b) <i>Kardiotoxizität und Verlängerung des QT-Intervalls</i>	16
c) <i>Störungen der Glucose-Homöostase</i>	17
1.2 Regulation der Glucose-Homöostase	17
1.2.1 Die Stimulus-Sekretions-Kopplung	18
1.2.2 Der „triggering pathway“ der Insulinsekretion	19
1.2.3 Die Bedeutung des K _{ATP} -Kanals als Transformator der biochemischen Signale in adäquate elektrische Reize	23
1.2.4 Der „amplifying pathway“ der Insulinsekretion	24
1.2.5 Der K _{ATP} -Kanal-unabhängige Signalmechanismus	25
1.2.6 Verhältnis zwischen den zytosolischen Ca ²⁺ -Signalmechanismen und der Glucose-induzierten Insulinsekretion	26
1.2.7 Die Exozytose der Sekretgranula	27
2. Zielsetzung und Fragestellung	28
3. Material und Methoden	30-85
3.1 Verwendete Lösungen und Medien	30
3.1.1 Basismedium für die Isolation der Langerhans-Inseln und der endokrinen B-Zellen	30
3.1.2 Lösungen der Zellisolation und Kulturmedien	31

3.1.2.1	1 N bzw. 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung	31
3.1.2.2	Collagenase P-Lösung	31
3.1.2.3	Ca^{2+} -freie Lösung für die Dissoziation der isolierten Langerhans-Inseln in die einzelnen B-Zellen	31
3.1.2.4	Collagen-Lösung für die Präparation der Deckgläschen	32
3.1.3	Nährmedien für die Kultivierung der isolierten B-Zellen	32
3.1.3.1	Kulturmedium RPMI 1640, modifiziert mit 10 mM Glucose	32
3.1.3.2	Kulturmedium RPMI 1640, modifiziert mit 5 mM Glucose	33
3.1.4	Analysenlösungen der eingesetzten Untersuchungsmethoden	33
3.1.4.1	Ciprofloxacin	33
3.1.4.2	Gatifloxacin	34
3.1.4.3	Lomefloxacin	35
3.1.4.4	Moxifloxacin	35
3.1.4.5	Norfloxacin	36
3.1.4.6	Synthetisierte N1-fluorphenylierte Fluorchinolon-Derivate	37
a)	Dimethyliertes p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1	37
b)	Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2	38
c)	p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)	38
d)	o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4	39
3.1.5	Perifusionslösungen der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie	40
3.1.5.1	HEPES-gepufferte Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung	40
3.1.5.2	50 μM D600 ((R,S)-Methoxyverapamil	41
3.1.5.3	49,5 mM Kaliumchlorid-Lösung	41
3.1.5.4	Mit 3 mM bzw. 10 mM D-Glucose-substituiertes Krebs-Ringer-Basismedium	42
3.1.5.5	Fura-2/AM	42
a)	1 mM Fura-2/AM-Stammlösung	42
b)	Inkubationslösung für die Beladung der isolierten B-Zellen bzw. der Pankreasinseln	42
c)	Inkubationslösung für die simulierte Inkubation der kultivierten B-Zellen	42
3.1.6	Medien der Spektrofluorimetrie	42
3.1.6.1	Ca^{2+} -freier Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	42
3.1.6.2	Ca^{2+} -freier Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, substituiert mit 3 mM D-Glucose und 1-prozentigem Albumin	43

	3.1.6.3	Mit 3 mM bzw. 10 mM D-Glucose modifizierter Krebs-Ringer-HEPES-Puffer	43
3.1.7		Medien der <i>patch clamp</i> -Analysen	43
	3.1.7.1	Extrazelluläre Lösung (EZ)	43
	3.1.7.2	Pipettenlösung bzw. intrazelluläre Lösung (IZ)	44
	3.1.7.3	50 mM Tolbutamid-Stammlösung	44
	3.1.7.4	300 mM bzw. 300 µM Diazoxid-Lösung	44
3.2		Spendertiere	45
	3.2.1	NMRI-Albinomäuse	45
	3.2.2	SUR1- <i>knock out</i> -Mäuse	45
3.3		Gewebeisolierung und nachfolgende Zellkultivierung	46
	3.3.1	Isolation der endokrinen B-Zellen nach dem konventionellen Collagenase-Digestions-Verfahren	46
	3.3.2	Isolation der endokrinen B-Zellen nach dem Verfahren der direkten Collagenase-Injektion	47
	3.3.3	Kultivierung der Pankreasinseln	49
	3.3.4	Kultivierung der endokrinen B-Zellen	49
3.4		Spektrofluorimetrie	50
	3.4.1	Parameter der spektrofluorimetrischen Registrierungen	52
	3.4.2	Registrierung der Exzitations- bzw. Emissionsspektren optisch aktiver Substanzen und Determinanten der Fluoreszenzintensität	53
3.5		Ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie	56
	3.5.1	Der Fluoreszenzindikator Fura-2	57
	3.5.2	Inkubation der Langerhans-Inseln bzw. endokrinen B-Zellen mit dem ratiometrischen Fluoreszenzindikator Fura-2	59
		3.5.2.1 Inkubation der isolierten B-Zellen mit dem Acetoxymethylester des Ca ²⁺ -selektiven Fluoreszenzindikators Fura-2	60
		3.5.2.2 Inkubation der isolierten Langerhans-Inseln mit dem Acetoxymethylester des Fluoreszenzindikators Fura-2	60
		3.5.2.3 Simulierte Inkubation der isolierten B-Zellen in Abwesenheit des Fluoreszenzindikators Fura-2	61
	3.5.3	Versuchsanordnung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie	61
		3.5.3.1 Quelle der Exzitationsstrahlung und Anregung des Fluoreszenzindikators	61
		3.5.3.2 Strahlengang durch das Epifluoreszenzmikroskop	62
		3.5.3.3 Registrierung der Fluoreszenzstrahlung durch digitale Bildverarbeitung	63

	3.5.3.4	Charakterisierung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration	64
	3.5.4	Praktische Durchführung der ratiometrischen Fluoreszenz-messungen	65
	3.5.5	Auswahlkriterien für die <i>regions of interest</i> (ROIs)	66
	3.5.6	Korrekturverfahren der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio und Be-rechnung der Ca^{2+} -regulierten Fura-Nettofluoreszenz-Ratio	67
3.6		Elektrophysiologische Messungen des Membranpotentials isolierter B-Zellen des Pankreas in dem <i>whole cell</i> -Modus	71
	3.6.1	Die <i>patch clamp</i> -Technik	71
	3.6.2	Herstellung der Patchpipette	72
	3.6.3	Elektroden der <i>patch clamp</i> -Messungen	73
	3.6.4	Herstellung der Agarbrücke	74
	3.6.5	Die Versuchsanordnung der <i>patch clamp</i> -Messungen	74
	3.6.6	Sealherstellung und Etablierung der <i>whole cell</i> -Konfiguration	75
	3.6.7	Auswertung der Messergebnisse	77
3.7		Computergestützte Simulation und Berechnung der Molekülgeometrie	77
	3.7.1	Verfahren des <i>Molecular Modelling</i>	78
	3.7.1.1	Kraftfeldmethoden	79
	3.7.1.2	Quantenmechanische Verfahren	80
	3.7.2	Berechnung der Molekülgeometrie	81
	3.7.3	Konformationssuche („ <i>conformational search</i> “)	83
	3.7.4	Berechnung des elektrostatischen Potentials	84
4.		Ergebnisse	86-178
4.1		Spektrofluorimetrische Charakterisierung der endogenen Fluoreszenz-eigenschaften ausgewählter Fluorchinolone	86
	4.1.1	Medien der Spektrofluorimetrie	87
	4.1.2	Qualitative und quantitative Fluoreszenzeigenschaften ausge-wählter Fluorchinolone	88
	4.1.2.1	Lomefloxacin	89
	4.1.2.2	Norfloxacin	91
	4.1.2.3	Gatifloxacin	93
	4.1.2.4	Moxifloxacin	95
	4.1.2.5	Ciprofloxacin	96
	4.1.2.6	Dimethyliertes <i>p</i> -Fluorphenyl-Fluorchinolon C1	98
	4.1.2.7	Dimethyliertes <i>o</i> -Fluorphenyl-Fluorchinolon C2	100
	4.1.2.8	<i>p</i> -Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)	102

	4.1.2.9 o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4	104
4.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus	108
4.2.1	Modifizierender Effekt eines mäßig effektiven Glucose-Stimulus gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen des Pankreas	109
4.2.2	Beeinträchtigung der Fura-Fluoreszenz-Ratio durch artifizielle Fluoreszenzsignale	112
4.2.3	Wirkung ausgewählter Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter Langerhans-Inseln bzw. pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus	115
4.2.3.1	<i>Wirkung des Fluorchinolons Lomefloxacin bzw. Norfloxacin auf die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration pankreatischer B-Zellen und Modifizierung des Effektes durch Tolbutamid sowie D600</i>	115
4.2.3.2	<i>Wirkung des Fluorchinolons C2 bzw. Lomefloxacin auf die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration isolierter Langerhans-Inseln</i>	117
4.2.4	Modulatorische Wirkung therapeutisch relevanter N1-Ethyl- bzw. N1-Cyclopropyl-Fluorchinolone gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration endokriner B-Zellen der NMRI-Albinomaus	119
4.2.4.1	<i>Lomefloxacin</i>	120
4.2.4.2	<i>Norfloxacin</i>	122
4.2.4.3	<i>Gatifloxacin</i>	125
4.2.4.4	<i>Moxifloxacin</i>	128
4.2.4.5	<i>Ciprofloxacin</i>	130
4.2.5	Modifizierende Wirkung congenerer N1-fluorphenylierter Fluorchinolon-Derivate auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration endokriner B-Zellen der NMRI-Albinomaus	133
4.2.5.1	<i>Dimethyliertes p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1</i>	134
4.2.5.2	<i>Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2</i>	136
4.2.5.3	<i>p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)</i>	139
4.2.5.4	<i>o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4</i>	142
4.3	K_{ATP}-Kanal-unabhängige Wirkung ausgewählter Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+}-Konzentration isolierter B-Zellen der SUR1-<i>knock out</i>-Maus	145
4.3.1	Lomefloxacin	146
4.3.2	Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2	149
4.3.3	Gatifloxacin	152

4.4	Depolarisierende Wirkung ausgewählter Fluorchinolonen auf das Membranpotential pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus	158
4.5	Korrelationen zwischen der betazytotropen bzw. insulinotropen Wirkung ausgewählter Fluorchinolone und der Molekülkonformation sowie dem elektrostatischen Potential	164
4.5.1	Berechnete Molekülgeometrien der Fluorchinolone	166
	<i>a) (Un)Methylierte und in der C8-Position methoxylierte Fluorchinolone: Gatifloxacin und Moxifloxacin</i>	<i>167</i>
	<i>b) Einfach bzw. zweifach methylierte Fluorchinolone: Lomefloxacin und das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2</i>	<i>168</i>
	<i>c) Unmethylierte Fluorchinolone: Norfloxacin und das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4</i>	<i>169</i>
4.5.2	Strukturvergleich zwischen den methylierten bzw. unmethylierten Fluorchinolonen in der jeweils energetisch begünstigten Konformation	170
	<i>a) Überlagerungen der betazytotropen Fluorchinolon-Derivate Lomefloxacin, Gatifloxacin und C2</i>	<i>170</i>
	<i>b) Überlagerungen der gegenüber den pankreatischen B-Zellen gering effektiven Fluorchinolone C4 und Moxifloxacin mit dem Fluorchinolon Norfloxacin</i>	<i>172</i>
	<i>c) Überlagerungen der betazytotropen Fluorchinolone C2 und Gatifloxacin mit den gering effektiven Fluorchinolonen C4 und Moxifloxacin</i>	<i>173</i>
4.5.3	Elektrostatisches Potential der Fluorchinolone	175
5.	Diskussion	179-216
5.1	Bedingungen und Problematiken der ratiometrischen Fluoreszenzmessungen	180
5.1.1	Verwendbarkeit der pankreatischen B-Zelle für die Charakterisierung der Fluorchinolon-induzierten Effekte gegenüber der zytosolischen Ca^{2+}-Konzentration	180
5.1.2	Identitätsprüfung der isolierten B-Zellen des Pankreas durch die Glucose-induzierte Stimulation und Ansprechbarkeit gegenüber einem externen K^{+}-Stimulus	181
5.1.3	Abhängigkeit der endogenen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone von den Umgebungsparametern	183
5.1.4	Interferenz zwischen der Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 und der endogenen Fluoreszenzaktivität der Fluorchinolone	185
5.1.5	Beeinträchtigung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio durch intrinsische Fluoreszenzsignale der Fluorchinolone	187
5.2	Wirkungen der untersuchten Fluorchinolone gegenüber den endokrinen B-Zellen des Pankreas	189

5.2.1	Korrelationen zwischen dem Ca^{2+} -steigernden Effekt und dem depolarisierenden Potential ausgewählter Fluorchinolone	189
a)	<i>$[\text{Ca}^{2+}]$-steigernde Effizienz der Fluorchinolone</i>	189
b)	<i>Depolarisierende Effizienz der Fluorchinolone</i>	190
5.2.2	Korrelationen zwischen den betazytotropen Effekten und der Wirkung der Fluorchinolone auf die Insulinsekretion	192
5.3	Wirkungen ausgewählter Fluorchinolone gegenüber den pankreatischen B-Zellen der SUR1-knock out-Maus	193
5.4	Potentielle Wirkungsmechanismen der betazytotropen bzw. insulinotropen Effekte ausgewählter Fluorchinolone	196
5.4.1	K_{ATP} -Kanal-abhängiger Mechanismus	196
5.4.2	Glucose-Selektivität der Fluorchinolone	197
5.4.3	K_{ATP} -unabhängige Signalmechanismen	198
a)	<i>Komplexierung freier Mg^{2+}- und Ca^{2+}-Ionen</i>	198
b)	<i>Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor</i>	200
c)	<i>Wirkungsmechanismen, die sich außerhalb des endokrinen Pankreas etablieren</i>	200
5.5	Korrelationen zwischen den experimentellen Ergebnissen und den in der Literatur veröffentlichten Daten	201
5.6	Assoziationen zwischen den strukturellen bzw. stereochemischen Eigenschaften der Fluorchinolone und Störungen der Glukose-Homöostase	204
5.6.1	Struktur-Wirkungs-Beziehung	204
5.6.2	Korrelationen zwischen dem Substitutionsprofil und den experimentellen Ergebnissen	205
a)	<i>N1-Position</i>	205
b)	<i>C7-Position</i>	205
c)	<i>C8-Position</i>	206
5.6.3	Stereochemische und elektrostatische Eigenschaften der Fluorchinolone	206
5.6.4	Zusammenhang zwischen der Affinität zu dem K_{ATP} -Kanal bzw. dem K_{HERG} -Kanal und den strukturellen Eigenschaften der Fluorchinolone	210
5.6.5	Strukturelle Gemeinsamkeiten der mit Störungen der Glucose-Homöostase assoziierten Fluorchinolone	213
a)	<i>Substitutionsprofil</i>	213
b)	<i>4-Chinolon-Grundkörper</i>	215
6.	Zusammenfassung	216-221
	Literaturverzeichnis	I-XXIII

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AM 1	Austin Methode 1
Å	Angström
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAPTA	1,2-Bis-(2-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CAMD	<i>Computer Aided Molecular Design</i>
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre bzw. zytosolische Calciumionenkonzentration
CaM	Calmodulin
CBS	<i>Chromatic Beam Splitter</i> (dichromatischer Strahlenteiler bzw. dichroider (Teiler)Spiegel)
CCD	<i>Charge Coupled Devices</i>
CCK	Cholecystokinin
CNDO	<i>Complete Neglect of Differential Overlap</i>
ΔΨ	Änderung des Membranpotentials bzw. Depolarisation
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
D600	(±)-Methoxyverapamil-Hydrochlorid
DAG	Diacylglycerol
DDD	<i>Defined Daily Dose</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Ex	Exzitation
EZ	extrazelluläre Lösung
F ₃₄₀	bei einer Exzitation von 340 nm induzierte Fluoreszenzemission
F ₃₈₀	bei einer Exzitation von 380 nm induzierte Fluoreszenzemission
FADH ₂	Flavinadenin-dinukleotid
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fötales Kälberserum)
Fura-2/AM	Fura-2-pentakis-(acetoxymethyl)-ester

Fura-2	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure, (trivial: 5-Oxalcarbonsäure)
°	Grad
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GIP	<i>glucose-dependent insulin-releasing peptide</i> , syn. <i>Glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
GLUT-2	Glucosetransporter, Subtyp 2
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GyrA	Untereinheit A der DNA-Gyrase (<i>E. coli</i> codiert)
GyrB	Untereinheit B der DNA-Gyrase (<i>E. coli</i> codiert)
g	Gravitationsbeschleunigung (9.81 m/s ²) bzw. Gramm
HEPES	4-[(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HERG	<i>human ether-à-go-go-related gene</i>
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
<i>i.e.</i>	<i>id est</i>
I.E.	Internationale Einheiten
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IZ	intrazelluläre Lösung
K _{ATP} -Kanal	ATP-sensitiver Kaliumionenkanal K _{ir} 6.2/SURX
K _d	Dissoziationskonstante
K _{Herg}	<i>delayed rectifying potassium channel</i> K _v 11.1 der Kardiomyozyten
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _{ir} X.Y	<i>inwardly rectifying potassium channel</i> (X: Familie, Y: Subform)
K _{ir} 6.2	porenbildende Untereinheit des K _{ATP} -Kanals der pankreatischen B-Zellen
KRHP	Krebs-Ringer-HEPES-Puffer
LCAO	Linear kombiniertes Atomorbital
LP	Langpaß-Filter
L-Typ	<i>large single conductance VDCC</i>
M	Mol bzw. Molarität (mol/l)
MEP	Molekulares elektrostatisches Potential
mg	Milligramm
MG	relative Molmasse (g/mol)
min	Minute
mM	millimolar (10 ⁻³ mol/l)
MM	<i>Molecular Mechanics</i>
MNDO	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>

MO	Molekülorbital
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme
mV	Millivolt
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NBF	<i>Nucleotide Binding Fold</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NSF	<i>α-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
Ω	Ohm
pA	Pikoampere (10^{-12} Ampere)
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAE	Postantibiotischer Effekt
ParC	Untereinheit C der Topoisomerase IV (<i>S. aureus</i> -codiert)
ParE	Untereinheit D der Topoisomerase IV (<i>S. aureus</i> -codiert)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC β	Phospholipase C der Subform β
PM3	Parametrische Methode 3
PMT	Photomultiplier
PP	Pankreatisches Polypeptid
QRDR	<i>Quinolone-Resistant Determining Region</i>
ROI	<i>Region of Interest</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SCF	<i>Self Consistent Field</i>
SEM	Standardfehler der Mittelwerte (<i>Standard Error of Means</i>)
SERCA	Sarko- und Endoplasmatische Ca^{2+} -ATPase
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
SNARE	SNAP-Rezeptor
SP	Schmalpaß-Filter
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
SUR1	<i>sulfonylurea receptor 1</i> (Sulfonylharnstoff-Rezeptor, Subtyp 1)
SUR1- <i>k.o.</i>	<i>SUR1-knock out</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
URL	<i>Uniform Resource Locator</i>
V	Volumen bzw. Volt
VDCC	<i>voltage-dependent Ca^{2+} channel</i> (spannungsabhängiger Calciumionenkanal)
VIP	<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>

1. Einleitung

1.1 Die Fluorchinolone

Die Fluorchinolone repräsentieren bakterizide Chemotherapeutika, die seit der Entdeckung der Leitsubstanz (1960) und der Einführung des ersten Vertreters, dem Naphthyridin-Derivat Nalidixinsäure (1963), in die antimikrobiellen Therapieregime (Brighty und Gootz, 2000) einen wichtigen Stellenwert sowohl in dem ambulanten als auch klinischen Bereich erlangt haben (Rubinstein, 2001; Shad, 2001). Die steigende Relevanz der Chinolone, insbesondere für die Therapie nosokomialer Infektionen und Kontaminationen mit multi-resistenten Erregern des Respirationstraktes (Brighty und Gootz, 2000; Mealy und Bayes, 2005; Schaumann und Rodloff, 2007), wird durch das kontinuierlich steigende Verordnungsvolumen (+ 12,9 %) reflektiert: Für das Jahr 2004 wurde ein Verordnungsvolumen von bereits 28,4 Mio. Tagesdosen (DDD) ermittelt, von denen 10,5 Mio. DDD auf Ciprofloxacin und 5,9 Mio. DDD auf Moxifloxacin entfielen. Das Racemat Ofloxacin sowie das S-(-)-Enantiomer Levofloxacin wurden mit einer Frequenz von 3,2 Mio. DDD bzw. 4,8 Mio. DDD vorrangig für die Therapie ambulant erworbener Infektionen eingesetzt. Nach Angaben der aktuellen Analysen rangieren die Fluorchinolone bereits als viertstärkste Verordnungsgruppe vor den Sulfonamiden und werden lediglich durch die Klasse der β -Lactame und Tetrazykline übertroffen (Kern, 2006).

Bemerkenswert ist neben der ausgeprägten bakteriziden Potenz dieser vollsynthetischen Arzneistoffklasse der signifikante postantibiotische Effekt (PAE), dessen Wirksamkeit nach Eliminierung des Pharmakons aus dem Infektionsort über einen Zeitraum von einer bis zwei Stunden anhält (Craig und Andes, 2003; Mitscher, 2005). Basierend auf den seit über drei Dekaden durchgeführten Untersuchungen hat sich herauskristallisiert, dass sich der Wirkungsmechanismus der Fluorchinolone nicht ausschließlich auf die Konzentrations-abhängige Inhibierung der DNA-Replikation und Zellproliferation limitiert, sondern gleichermaßen die Adhärenz der Mikroorganismen an die Epithelzellen des Makroorganismus und implizit die frühe Phase der Infektion interferiert wird. Ebenso wurde offensichtlich, dass die bakteriziden Effekte gegenüber empfindlichen Bakterienspezies in allen Phasen des Zellwachstums mit hoher Potenz wirksam werden (Young, 2003). In ergänzenden Studien wurde die effektive Akkumulation der Fluorchinolone innerhalb der Phagozyten und Makrophagen sowie anderer Zellen des Immunsystems beobachtet, wodurch die Phagozytose intrazellulär persistierender Bakterien erheblich gefördert wird (Rolain und Raoult, 2003).

Die kontinuierlich steigende Resistenzrate gegenüber den Vertretern der ersten und zweiten Generation - bereits 20 % der isolierten *Escherichia coli*-Stämme reagieren gegenüber Ciprofloxacin unempfindlich - hat die Entwicklung neuartiger Derivate erheblich forciert. Von den über 30.000 modulierten Derivaten (Schaumann und Rodloff, 2007) sind zahlreiche Fluorchinolone abgeleitet worden, die nach therapeutischen Kriterien in vier Gruppen differenziert werden (Kern, 2006; s. Abb. 1.1.1): Die gering bedeutenden „Harnwegs-Fluorchinolone“ (Gruppe A) mit Norfloxacin und Enoxacin als wichtigste Vertreter, die therapeutisch relevanten „systemischen Fluorchinolone“ (Gruppe B), deren Repräsentanten Levofloxacin und Ciprofloxacin bereits der Stellenwert als „Standard-Fluorchinolone“ beigemessen wird, und die effektiv gegenüber grampositiven Spezies und atypischen Erregern bakteriziden „Breitspektrum-Fluorchinolone“ (Gruppe C), unter anderem Sitafoxacin (Kern, 2006). Aufgrund der ausgeprägten zytotoxischen Wirkung der Chinolon-Derivate Levofloxacin und Gatifloxacin gegenüber den multiresistenten Stämmen der grampositiven Gattungen *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* (MRSA) wurde als vierte Klasse die „respiratorischen Fluorchinolone“ (Gruppe D) definiert (Stefani, 2005). Alternativ zu dieser Klassifizierung hat sich auf der Basis pharmakodynamischer Kriterien und nach Empfehlungen der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (Naber und Adam, 1998) die Differenzierung in vier Generationen etabliert (Schaumann und Rodloff, 2007), die im Wesentlichen mit der in Abbildung 1.1.1 dargestellten Entwicklungslinie korreliert.

Die zukünftige Perspektive der Chinolon-Modifizierung konzentriert sich primär auf die Entwicklung neuartiger Therapieoptionen auf dem Gebiet respiratorischer Infektionen, insbesondere der chronischen Bronchitis und der Tuberkulose. In klinischen Untersuchungen hat sich das 2004 lancierte Fluorchinolon Gemifloxacin bereits für die Therapie akuter bakterieller Exazerbationen der chronischen Bronchitis bewährt. In Relation zu den etablierten Antibiotika induziert die Substanz eine effektive Eradikation multiresistenter Stämme der Gattung *Streptococcus pneumoniae* (Mealy und Bayes, 2004). In Anbetracht der zunehmenden Restriktion der Tuberkulose-Therapie durch die steigende Resistenzrate, werden die Fluorchinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin als zukünftige Tuberkulostatika aufgefasst, die in klinischen Studien der Phase II zu einer signifikanten Verkürzung der sechs Monate umfassenden Standardtherapie geführt haben (WHO, 2006a und b).

1.1.1 Die Entwicklung der vier Fluorchinolon-Generationen

Derart effektive Chemotherapeutika wie die Klasse der Fluorchinolone sind das Resultat einer kontinuierlichen Strukturmodifizierung der ursprünglich aus der Chloroquin-Synthese isolierten Leitstruktur 7-Chlor-4-hydroxychinolin-3-carbonsäure (Leshner et al.,

1962), von der als erster therapeutischer Repräsentant das Naphthyridin-Derivat Nalidixinsäure abgeleitet wurde (Mitscher, 2005). Die Einführung neuartiger Synthesemethoden, insbesondere des Cycloarylierungs-Verfahren nach Grohe-Heitzer (Grohe und Heitzer, 1987), ermöglichte die progressive Entwicklung von derzeit vier Fluorchinolone-Generationen mit divergenten Wirkungsspektren, bakteriziden Potenzen und verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005). In diesem Zusammenhang haben sowohl die Fluorierung der C6-Position (Domagala et al., 1986; Emmerson und Jones, 2003; Mitscher und Ma, 2003; Schaumann und Rodloff, 2007) als auch die Modifizierung der C7-Position mit einem Piperidyl- bzw. Piperazyl-Substituenten (Brighty und Gootz, 2000; Domagala und Hagen, 2003; Mitscher, 2005) einen bedeutenden Beitrag geleistet, um die ausschließlich gegenüber gramnegativen Opportunisten, unter anderem *Escherichia coli*, moderat wirksamen Chinolone der ersten Generation in die wesentlich potenteren Fluorchinolone der zweiten Generation zu transformieren. Der entscheidende Durchbruch wurde 1980 mit der Einführung des Fluorchinolons Norfloxacin erzielt, dem bereits ein mit den klassischen Penicillinen vergleichbarer Stellenwert eingeräumt wird (Mitscher, 2005).

Als wichtigstes Fluorchinolon der zweiten Generation ist jedoch Ciprofloxacin anzusehen, das sich aufgrund der oralen als auch parenteralen Verfügbarkeit, der ausgeprägten bakteriziden Potenz in dem gramnegativen Bereich und des günstigen Sicherheitsprofils global als Standardtherapeutikum etabliert hat (Ball, 2003; Mitscher, 2005). Dieses verbesserte pharmakodynamische und -kinetische Profil basiert auf dem erstmals bei diesem Derivat eingeführten N1-Cyclopropyl-Substituenten, der aufgrund der signifikanten Wirkungssteigerung innerhalb des gramnegativen Spektrums für die Derivate der nachfolgenden Generationen, *i.e.* Clinafloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin und Garenoxacin, eine obligatorische Strukturkomponente darstellt (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005; Schaumann und Rodloff, 2007).

Im Verlauf der Forschungsarbeiten wurde evident, dass für den bakteriziden Wirkungsmechanismus die konjugationsfähige Carbonyl-Carboxyl-Sequenz in der C3- und C4-Position, in Kombination mit dem vinylogenen Stickstoffatom des Fluorchinolone-Grundgerüsts, essentiell ist (Brighty und Gootz, 2000; Neu, 1994) und keiner Modifizierung unterzogen werden darf. Die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften lassen sich hingegen durch gezielte Modulationen des Substitutionsprofils in der N1-Position sowie in der C5-, C7- und C8-Position steuern (Brighty und Gootz, 2000; Domagala und Hagen, 2003; Mitscher, 2005; Schaumann und Rodloff, 2007). Die erfolgreichsten

Innovationen korrelieren mit der Präsenz basischer Heterozyklen in der C7-Stellung, wobei sich sterisch anspruchsvolle Methylpiperazin-, Pyrrolidin- und Azabicyclo-Derivate bewährt haben (Brighty und Gootz, 2000; Domagala und Hagen, 2003; Mitscher, 2005).

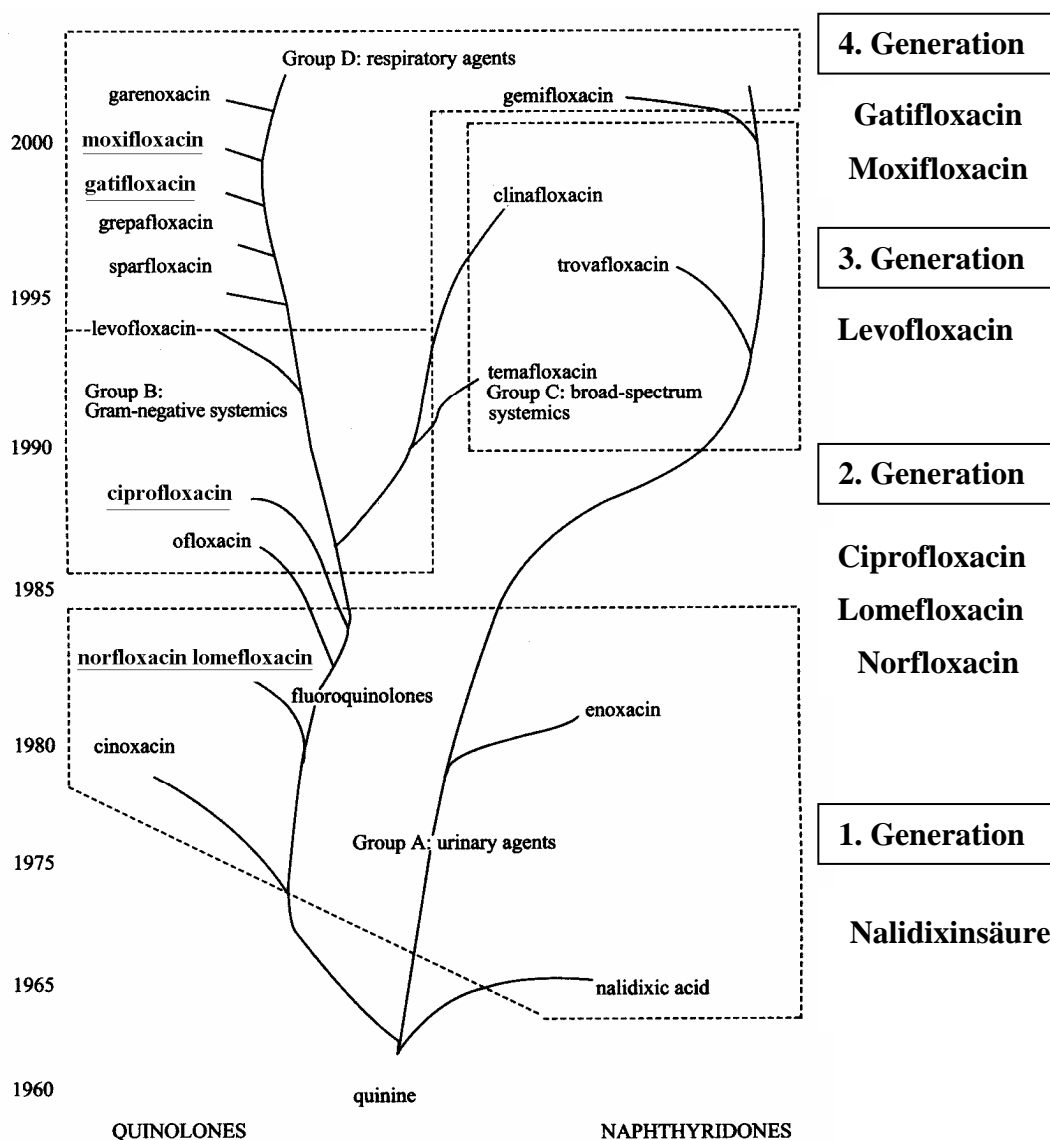


Abbildung 1.1.1 Entwicklungslinie der vier Fluorchinolon-Generationen
 Ausgehend von der Isolation der Leitstruktur, einem Zwischenprodukt der Chloroquin-Synthese, zu Beginn der 1960er Jahre bis zu dem aktuellen Zeitpunkt wurden über 30.000 4-Chinolon- bzw. Naphthyridin-Derivate konstruiert und einem Screening unterzogen (Schaumann und Rodloff, 2007). Von diesen wurden zahlreiche Substanzen in die Therapieregime eingeführt, die basierend auf der progressiven Entwicklung der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften in vier Generationen klassifiziert werden (Naber und Adam, 1998). Als Einteilungskriterium gilt für die dritte Generation eine gesteigerte Aktivität gegenüber grampositiven Bakteriengattungen, während die Vertreter der vierten Generation atypische und obligate Anaerobier in ihrem Wirkungsspektrum erfassen müssen (Naber und Adam, 1998; Schaumann und Rodloff, 2007). Die in dieser Arbeit analysierten Fluorchinolone sind in der Abbildung unterstrichen dargestellt. (Modifiziert nach Andersson und McGowan, 2003).

Effiziente Toxizitäten gegenüber den humanpathogenen Erregern des grampositiven Spektrums ließen sich jedoch erst mit der Entwicklung der dritten und vierten Fluorchinolone-Generation realisieren, für deren strukturelle Eigenschaften die Präsenz fluorierter Arylsubstituenten in der N1-Position bzw. die stereoselektive Restriktion des N1-Substituenten durch die Verbrückung mit dem C8-Atom und eine gesteigerte Lipophilie kennzeichnend sind (Domagala und Hagen, 2003; Mitscher, 2005). Demzufolge gelten bakterizide Eigenschaften gegenüber pathogenen Bakterienspezies des grampositiven Spektrums als Klassifizierungskriterium für die dritte Fluorchinolone-Generation (Brighty und Gootz, 2000; Naber und Adam, 1998). Als prominenter Vertreter ist das trizyklische S-Enantiomer Levofloxacin des Racemats Ofloxacin anzuführen, dessen Isolation erstmals die Bedeutung der Stereoselektivität für das Ausmaß der bakteriziden Potenz verdeutlicht hat (Brighty und Gootz, 2000; Domagala und Hagen, 2003).

Der Austausch der bisher obligaten C7-Piperazyl-Komponente durch komplexe Pyrrolidin-Derivate (Trovafoxacin, Clinafoxacin) oder bizyklische Amine (Moxifloxacin, Garenoxacin) in Kombination mit einem geeigneten C8-Strukturmotiv, vorzugsweise einem Halogen oder einer Methoxy-Gruppe, führte zu einer effektiven Erweiterung des antibakteriellen Spektrums in den anaeroben Bereich (Brighty und Gootz, 2000; Holzgrabe, 2000; Mitscher, 2005; Schaumann und Rodloff, 2007). Die Ergebnisse unabhängiger *in vitro*-Studien konnten belegen, dass die Anwesenheit der C8-Methoxygruppe oder eines Chlor- bzw. Fluoratoms mit potenten bakteriziden Effekten gegenüber den natürlich resistenten Gattungen *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* und *Treponema pallidum* korreliert (Brighty und Gootz, 2000; Domagala und Hagen, 2003; Drlica und Hooper, 2003). Ebenso gelang es, bereits resistente Bakterien-Stämme, unter anderem der Gattung *Staphylococcus aureus*, in das Wirkungsspektrum der jüngeren Fluorchinolone Clinafoxacin und Sitafoxacin zu integrieren (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005).

Mit der kontinuierlichen Erweiterung des Wirkungsspektrums ist jedoch in der Regel ein Verlust der bakteriziden Potenz innerhalb des gramnegativen Bereichs verbunden. Als ursächlicher Faktor wird die Reduktion der hydrophilen Moleküleigenschaften angesehen, die mit einer limitierten Penetrationsfähigkeit in die gramnegative Bakterienzelle korreliert (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher und Ma, 2003; Mitscher, 2005). Nur wenige Fluorchinolone der jüngeren Generationen (Clinafoxacin, Sitafoxacin) besitzen eine gleichwertige oder stärker ausgeprägte antimikrobielle Potenz als das Referenz-Fluorchinolone Ciprofloxacin (Brighty und Gootz, 2000).

Definitionsgemäß werden Fluorchinolone, deren bakterizide Wirkung die Eradikation anaerober Bakterienspezies ermöglicht, der vierten Generation zugeordnet (Brighty und Gootz, 2000; Naber und Adam, 1998). Das Fluorchinolon Garenoxacin (Stefani, 2005) und das besonders wirkungsvolle Naphthyridin-Derivat Gemifloxacin repräsentieren innovative Vertreter dieser Generation, deren bakterizide Eigenschaften einen weiten Bereich des grampositiven Spektrums sowie zahlreiche atypische Anaerobier erfasst (Brighty und Gootz, 2000). Weitere Vorteile der jüngeren Fluorchinolon-Derivate sind die deutlich verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften. Diese verleihen dem Wirkstoff eine erhöhte Bioverfügbarkeit und eine effiziente Akkumulationsfähigkeit innerhalb des Zielgewebes bzw. der Mikroorganismen, die dementsprechend die Reduktion der Dosierfrequenz auf eine einmalige Tagesdosis gestatten (Dudley, 2003). Die zukünftige Entwicklungslinie dieser Chemotherapeutika-Klasse wird durch defluorierte Chinolon-Derivate (Mitscher, 2005) und Diarylfluorchinolone, unter anderem TMC 207, fortgesetzt, deren antituberkuläre Potenz derzeit im Rahmen klinischer Studien der Phase II untersucht wird (WHO, 2006a/b).

1.1.2 Der Wirkungsmechanismus der Fluorchinolone

Als primäre Zielstrukturen der Fluorchinolon-induzierten Bakterizidie wurden unabhängig voneinander zwei essentielle Enzyme innerhalb der Prokaryonten identifiziert: DNA-Gyrase (Gellert et al., 1976; Sugino et al., 1977) und Topoisomerase IV (Ferrero et al., 1994; Hoshino et al., 1994). Beide Enzyme repräsentieren Subformen der Klasse II-Topoisomerasen, im engeren Sinne der Subfamilie IIA (Champoux, 2001), deren Mitglieder ubiquitär sowohl in Viren, Prokaryonten (Archea- und Eubacteria) als auch in eukaryontischen Einzellern (*Saccharomyceten*) und höher organisierten Systemen, wie beispielsweise dem Säugetierorganismus, exprimiert werden (Champoux, 2001). Das funktionelle Charakteristikum der Klasse II-Topoisomerasen ist die Regulation der räumlichen Organisation (Topologie) der helikalen DNA-Duplex (dsDNA) durch die ATP-abhängige Einführung von Doppelstrangbrüchen. Dieser Prozess ermöglicht die linksorientierte (negative) oder rechtsgängige (positive) Superspiralisierung („*supercoiling*“) der linearen oder kovalent geschlossenen dsDNA-Helix, wie es das Bakterienchromosom oder das extrachromosomale Plasmid darstellt. Gleichgroße dsDNA-Moleküle mit einer identischen Basensequenz, jedoch einem divergenten superhelikalen Spiralisierungsstatus, werden dementsprechend als Topoisomere bezeichnet, die nur durch Strangbrüche ineinander überführt werden können.

Ein zentraler Aspekt der enzymatisch regulierten dsDNA-Topologie ist die Gyrase-katalysierte superhelikale Kondensation des 1100 µm bis 1300 µm umfassenden Bakterien-

chromosoms (Smith, 1986), so dass die vollständige Integration in die mikroskopische Dimension einer Bakterienzelle von 1 μm x 2 μm realisiert werden kann. Die Relaxierung partieller Sequenzen des hochkondensierten Bakterienchromosoms ist für die Replikation, die Transkription und die Rekombination der genetischen Informationen sowie die Reparaturmechanismen ebenso erforderlich, wie die Eliminierung der mit diesen Prozessen einhergehenden Torsionsspannungen oberhalb und unterhalb des Replikationssystems (Drlica und Hooper, 2003; Mitscher 2005). Die DNA-Gyrase eliminiert oberhalb des unidirektional fortschreitenden Replikationskomplexes durch die negative, superhelicale Spiralisierung positive Superhelices, während die Topoisomerase IV die Relaxierung toroidaler Spannungen in den distalen Bereichen unterhalb des Komplexes katalysiert (Champoux, 2001; Heisig und Wiedemann, 2001). Eine weitere wichtige Funktion der Topoisomerase IV stellt die Trennung (Decatenierung) der nach einem vollständigen Replikationszyklus resultierenden Chromosomen der Nachfolgeneration dar, die wie die Glieder einer Kette (lat. *catena*) miteinander verbunden sind (Heisig und Wiedemann, 2001; Postow et al., 2001).

In Bezug auf das dominierende Target-System der Fluorchinolone lassen sich sensible Mikroorganismen nach dem derzeitigen Verständnis drei Kategorien zuordnen (Drlica und Hooper, 2003): Den ersten beiden Kategorien gehören gramnegative bzw. grampositive Spezies an, bei denen vorrangig Gyrase oder Topoisomerase IV als Zielstruktur antagonisiert wird. In der Regel zeigt die DNA-Gyrase gramnegativer Bakteriengattungen (*Escherichia coli*) eine höhere Sensibilität, wohingegen in grampositiven Gattungen (*Staphylococcus aureus*) der Topoisomerase IV-dsDNA-Komplex als Targetsystem von den Fluorchinolonen favorisiert wird (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005). Humanpathogene Bakterienspezies der dritten Kategorie, deren Genom nicht für Topoisomerase IV oder homologe Isoformen codiert, scheinen als einzige Zielstruktur DNA-Gyrase zu exprimieren. Die Gyrase-Isoform dieser Gattungen, zu denen unter anderem *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* und *Treponema pallidum* zählen, ist aufgrund einer geringen Varianz der Aminosäuresequenz in der so genannten „quinolone-resistant determining region“ (QRDR) durch eine marginale bis geringe Fluorchinolone-Sensibilität gekennzeichnet (Drlica und Hooper, 2003). Eine Konsequenz der verminderten Bindungsfähigkeit ist die ineffektive bakterizide Potenz einiger Fluorchinolone, vor allem der ersten Generationen, gegenüber Anaerobiern und grampositiven Bakterien. Wie bereits dargelegt, können durch gezielte Strukturmodifizierungen derartige Resistenzmechanismen partiell oder vollständig kompensiert werden (Domagala und Hagen, 2003; Drlica und Hooper, 2003) und den Fluorchinolonen der jüngeren Generationen potente Wirkungen

gegenüber beiden Subformen der Klasse II-Topoisomerasen verliehen werden (Brighty und Gootz, 2000; Drlica und Hooper, 2005; Schaumann und Rodloff, 2007). Diese Vertreter, die vorwiegend der dritten und vierten Generation angehören, werden demgemäß als „*dual target quinolones*“ bezeichnet (Hooper, 2000; Mitscher, 2005).

Weder der antibakterielle Wirkungsmechanismus der Fluorchinolone noch der Interaktionscharakter sind bisher detailliert aufgeklärt. Als allgemein akzeptierter Konsensus wurde jedoch auf der Grundlage der aus dem Bakterium *Escherichia coli* isolierten DNA-Gyrase das Modell eines ternären Komplexes entwickelt (Drlica und Hooper, 2003; Heisig und Wiedemann, 2001; Mitscher, 2005). Diesem zufolge induziert die Interaktion der Fluorchinolone mit dem Enzym-Substrat-Komplex in der intermediären Phase der superhelikalen dsDNA-Spiralisierung die Arretierung der Replikations- bzw. Transkriptionsprozesse. Die Stabilisierung dieses Intermediates in dem resultierenden ternären Komplex – bestehend aus dem Fluorchinolon und dem kovalent an die Substrant-DNA gebundenen Enzym – , korreliert mit der Inhibierung der DNA-Synthese. Allgemein wird dieser Komplex als „*cleavable complex*“ aufgefasst (Drlica und Hooper, 2003; Mitscher, 2005). Eine stabilisierende Funktion von Mg^{2+} -Ionen wird diskutiert, ist jedoch nicht eindeutig belegt.

Aufgrund des reversiblen Charakters der Fluorchinolon-induzierten Konstitution des spaltungsfähigen Komplexes wird lediglich die DNA-Synthese und implizit die Teilungsaktivität der Bakterienzelle und deren Kolonisationsfähigkeit gehemmt (Drlica und Hooper, 2003). Bakterizide Effekte erfordern dagegen die Freisetzung der komplementären DNA-Stränge bzw. einzelner Nukleinsäure-Fragmente aus dem ternären Komplex (Schmitz et al., 2002). Dieser irreversible Prozess manifestiert sich unabhängig von der Bindung der Fluorchinolone durch die sukzessive Aktivierung letaler Mechanismen (Brighty und Gootz, 2000; Hawkey, 2003; Schmitz et al., 2002). In Abhängigkeit von dem Fluorchinolon-Derivat ist für die Aktivierung dieser toxischen Prozesse bei einigen Vertretern der ersten Generation, unter anderem der Nalidixinsäure, die Synthese spezifischer Proteine erforderlich (Drlica und Hooper, 2003; Goss et al., 1965). Demgegenüber sind Fluorchinolone der jüngeren Generation in der Lage, unabhängig von der Proteinbiosynthese bakterizide Effekte zu induzieren (Lewis et al., 1991; Mitscher, 2005). Nachgewiesen wurde die Induktion von Reparaturprozessen durch Proteine des SOS-Systems (Brighty und Gootz, 2000; Heisig und Wiedemann, 2002; Mitscher, 2005, Schmitz et al., 2002) sowie die Initiierung der Hitzeschockreaktion, die jedoch keine zelltoxischen Konsequenzen aufweist.

Hinsichtlich des von der Proteinbiosynthese unabhängigen bakteriziden Effektes des Fluorchinolons Ciprofloxacin sowie anderer moderner Vertreter wird die potentielle

Dissoziation der Gyrase-Untereinheiten GyrA und GyrB und die dadurch resultierende Freisetzung von Fragmenten der Substrat-dsDNA als grundlegender Mechanismus postuliert (Mitscher, 2005). Diese als „*positional poison model*“ definierte Vorstellung (Kingma und Osheroff, 1997) geht davon aus, dass die Interaktion der Fluorchinolone mit dem Target eine Deformation der Substrat-dsDNA verursacht und damit verbunden eine Störung der streng regulierten Katalyse hervorgerufen wird. Als ursächlicher Mechanismus wurde in einigen Studien eine Konformationsänderung innerhalb des Topoisomerase-dsDNA-Komplexes beobachtet (Brighty und Gootz, 2003; Drlica und Hooper, 2003), wodurch die kovalent gebundene dsDNA zu einem bevorzugten Substrat für die Etablierung von Strangbrüchen ohne terminale Religation konvertiert wurde (Khordursky und Cozzarelli, 1998; Mariani und Hiasa, 1997).

In der Gesamtheit wird die Exposition der Bakterienzellen mit den Fluorchinolonen von zahlreichen physiologischen Effekten begleitet (Maxwell und Critchlow, 1998), was die bakterizide Wirkung der Substanzen begründet:

- Inhibierung der Transkription, Replikation und DNA-Synthese
- Verlust der Konjugationsfähigkeit und Proteinbiosynthese
- DNA-Defekte und Verlust von Plasmiden
- Verringerung des negativen superhelikalen Spiralisierungsgrades



- Filamentierung und Vakuolisierung der Bakterienzelle (Bakteriostase)
- Steigerung der Mutationsrate
- Induktion der SOS-Antwort und der Hitzeschockreaktion (Bakterizidie)

1.1.3 Die Struktur-Wirkungs-Beziehung

Die Identifizierung der prokaryontischen Klasse II-Topoisomerasen der Subform II und IV als Zielstruktur der Fluorchinolone sowie die Entwicklung erster Modell-Vorstellungen über den letalen Wirkungsmechanismus führten zu der Erkenntnis, dass die bakterizide Potenz durch die strukturellen und chemischen Eigenschaften der Substanzen determiniert wird. Dies betrifft vor allem die Bindungsfähigkeit, den stereoselektiven Bindungscharakter und das Ausmaß der Bindungsstärke an die Zielstrukturen (Brighty und Gootz, 2000; Domagala et al., 1986; Drlica und Hooper, 2003; Mitscher, 2005). Für die bakterizide Wirkstärke der Fluorchinolone scheint neben dem Substitutionsprofil eine antiplanare Stereochemie, bei der sich die Ebene des C7-Substituenten vertikal zu der Ringebene des Grundgerüsts orientiert, mit einer erhöhten Affinität und Bindungsstärke an

dem intermediären Komplex zu korrelieren (Mitscher, 2005). Postuliert wird die Existenz einer lipophilen Bindungskavität, die während der Bildung des Topoisomerase-dsDNA-Intermediates in dem Komplex konstituiert wird. Die Orientierung lipophiler, voluminöser Substituenten außerhalb der Ebene des 4-Chinolon-Grundgerüsts scheint die optimale Positionierung innerhalb dieser Kavität und damit verbunden die Bindungsfähigkeit zu fördern (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005). Bewährt haben sich unter anderem methylierte C7-Piperazyl-Sequenzen sowie die Präsenz eines Ethyl-, Cyclopropyl- oder Fluorphenyl-Substituenten in der N1-Position (Mitscher, 2005). Bestätigt wurde diese Annahme durch Untersuchungen von Rosen et al., in denen die proximale, asymmetrische Modifizierung des Piperazyl-Motivs mit sterisch anspruchsvollen Alkyl-Gruppen zu einer signifikanten Steigerung der bakteriziden Potenz geführt hat (Rosen et al., 1988). Als grundlegender Mechanismus wird die sterische Hinderung der freien Rotationsfähigkeit infolge einer erhöhten Torsionsspannung vermutet (Mitscher, 2005). Basierend auf diesen Beobachtungen wurden zahlreiche potente Fluorchinolone mit einem einfach bzw. zweifach methylierten C7-Piperazyl-Substituenten synthetisiert, die gleichzeitig durch eine Ethyl-, Cyclopropyl- oder eine Fluorphenyl-Sequenz an dem vinylogenen Stickstoffatom des Grundgerüsts gekennzeichnet waren. Es resultierten therapeutisch relevante Vertreter, wie zum Beispiel Clinafloxacin, Grepafloxacin, Sparfloxacin sowie Temafloxacin, Moxifloxacin und Gatifloxacin.

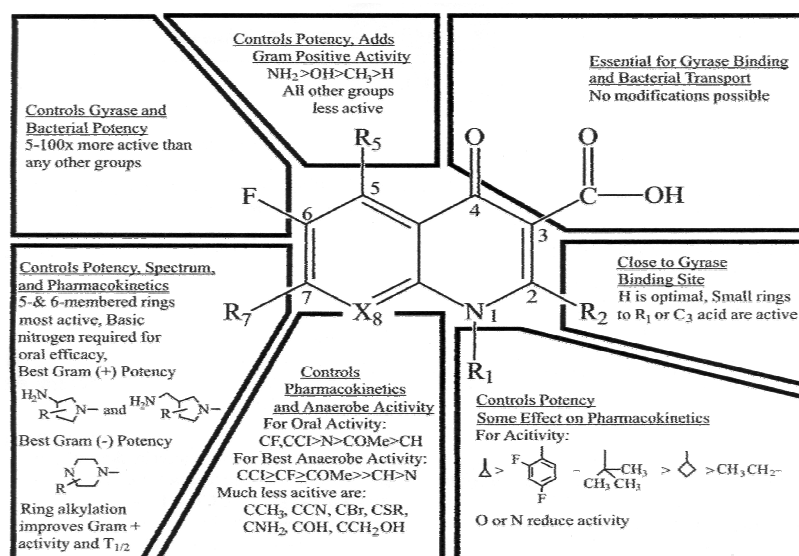


Abbildung 1.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehung der Fluorchinolone Die in genetischen, biochemischen und spektroskopischen Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse ermöglichten die Konstitution einer allgemein gültigen Struktur-Wirkungs-Beziehung. Spezifische Struktur motive in der N1-, C7- und C8-Position haben sich als besonders erfolgreiche Komponenten etabliert, die den Fluorchinolonen ausgeprägte bakterizide Eigenschaften verleihen. Die wichtigsten Erkenntnisse sind in der von Domagala aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehung zusammengefasst (Domagala, 1994).

In der Abbildung 1.1.3 sind die wichtigsten Beziehungen zwischen den pharmakodynamischen bzw. -kinetischen Eigenschaften und den assoziierten Strukturmotiven zusammengefasst. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass durch komplexe inter- und intramolekulare Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Substituenten sowohl die pharmakokinetischen Eigenschaften als auch der pharmakodynamische Charakter der Substanzen determiniert werden (Brighty und Gootz, 2000; Domagala und Hooper, 2003; Mitscher, 2005). Dieser Sachverhalt wurde unter anderem durch Untersuchungen des elektrochemischen Potentials bestätigt (Chidangil et al., 2004).

Ebenso wie die Aufstellung eines Struktur-Wirkungs-Verhältnisses, ermöglichte das zunehmende Verständnis über die toxischen Eigenschaften dieser Chemotherapeutika-Klasse die Korrelation zwischen zytotoxischen Effekten und spezifischen Strukturmotiven. Die Verfügbarkeit valider Daten über das Sicherheitsprofil therapeutisch etablierter Fluorchinolone verdeutlicht, dass mit dem steigenden Ausmaß der Struktur-Modifizierung das zyto- bzw. genotoxische Potential gegenüber dem Makroorganismus gesteigert wird (Lode und Rubinstein, 2003; Stahlmann und Höffler, 2000). Dieses limitiert sich in Bezug auf die phototoxischen und hepatotoxischen Eigenschaften sowie die hämolytischen und immunotoxischen Wirkungen auf spezifische Derivate, während Störungen des Zentralnervensystems und des Gastrointestinaltraktes sowie Tendo- und Arthropathien überwiegend als Klasseneffekte aufgefasst werden (Stahlmann und Lode, 1998; Rubinstein, 2000). Zunehmende Aufmerksamkeit wurde in den letzten Jahren auf kardiotoxische Störungen und Interferenzen mit der Glucose-Homöostase gelenkt, die bei einigen Fluorchinolonen der jüngeren Generationen mit hoher Inzidenz aufgetreten sind.

In den folgenden Ausführungen werden explizit für jede Position des 4-Chinolon-Grundgerüsts die wichtigsten Struktur-Wirkungs-Verhältnisse im Hinblick auf die bakterizide Potenz und die toxischen Eigenschaften charakterisiert. Für die endgültige Bewertung sowohl der biologischen Aktivität als auch des toxischen Potentials sind jedoch das gesamte Substitutionsprofil und die räumlichen Verhältnisse in dem Molekül (Stereochemie) entscheidend (Mitscher und Ma, 2003).

a) N1-Position:

Struktur-Wirkungs-Verhältnis: Die ursprüngliche Substituierung des vinylogon Chinolon-N-Atoms mit einer Ethyl-Gruppe führte zu der Verschiebung des tautomeren Gleichgewichtes zugunsten des 4-Chinolon-Tautomers. Die resultierende sterische Fixierung der Carbonyl-Funktion korreliert nachweislich mit einer effektiveren Wirksamkeit, einem

Indiz für die biologische Aktivität dieser Funktion (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005). Der chemische Charakter des N1-Substituenten determiniert die bakterizide Potenz. Bewährt haben sich neben hydrophoben, unverzweigten Kohlenwasserstoffen (Methyl-, Ethyl-) Cyclopropyl- sowie Fluorphenyl-Sequenzen. Es wird angenommen, dass diese sterisch anspruchslosen Substituenten mit der postulierten hydrophoben Kavität in dem ternären Enzym-dsDNA-Komplex optimal interagieren (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005; Mitscher und Ma, 2003).

Struktur-Toxizitäts-Verhältnis: Die Präsenz des 2',4'-Difluorphenyl-Substituenten in der N1-Position wird mit schwerwiegenden zytotoxischen Effekten assoziiert (Andersson und MacGowan, 2003; Ball, 2003; Owens und Ambrose, 2005), die sich bei Temafloxacin durch das urämisch-hämolytische Syndrom sowie bei Trovafloxacin durch akute hepatotoxische Wirkungen mit letalen Folgen manifestiert haben.

b) C3- und C4-Position:

Struktur-Wirkungs-Verhältnis: Essentiell für die bakterizide Wirkung der Chinolone ist die Carboxyl-Funktion in Kombination mit der Carbonyl-Gruppe in der C4-Position, vorzugsweise in einer planaren Konformation. Entsprechend den postulierten Modellvorstellungen des ternären Enzym-dsDNA-Komplexes, scheint die Carboxyl-Carbonyl-Sequenz über Wasserstoffbrückenbindungen mit den Basen der Substrat-dsDNA zu interagieren (Drlica und Hooper, 2003; Mitscher, 2005). Ferner wird angenommen, dass die Carbonyl-Funktion - unter Berücksichtigung des vinylogenen N1-Stickstoffatoms - für die biologische Aktivität bedeutungsvoll zu sein (Brighty und Gootz, 2000). Modifizierungen dieser Struktur-Komponente erwiesen sich in der Regel als unvorteilhaft oder führten zu einem Verlust der bakteriziden Potenz (Mitscher, 2005).

Struktur-Toxizitäts-Verhältnis: Die Inzidenz für Arthropathien ist im Vergleich zu anderen antimikrobiellen Wirkstoff-Klassen bei den Fluorchinolonen deutlich höher ausgeprägt (14,7 % versus 0,3 %, Owen und Ambrose, 2005). Für die Fluorchinolon-assoziierten Schädigungen der kartilaginären Strukturen sowie den damit einhergehenden pathogenen Knorpel- und Sehnenveränderungen (Tendopathien) scheint die Koordination von Mg^{2+} -Ionen an die Carbonyl-Carboxyl-Sequenz eine Schlüsselstellung einzunehmen (Förster et al., 1996; Shakibaei 2002). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass durch die Fixierung von Mg^{2+} -Ionen innerhalb von Chelatkomplexen ein funktioneller Mangelzustand eintritt (Förster et al., 1998; Shakibaei et al., 2002). Dies führt, insbesondere in den nur mäßig bis sehr gering vaskulisierten Matrixstrukturen des Bindegewebes, zu schwerwiegenden

Gleichgewichtsstörungen der Blastozyten-Interaktionen sowie funktionellen Veränderungen der Integrin-Rezeptoren (Burkhardt et al., 1997), die auf der Plasmamembran der Chondrozyten präsentiert werden. In diesen extrazellulären Geweben ist ein Elektrolytmangel nur schwer kompensierbar (Stahlmann, 2002).

c) **C6-Position:**

Struktur-Wirkungs-Verhältnis: Die Fluorierung der klassischen Chinolone der ersten Generation bewirkte eine deutliche Steigerung der antibakteriellen bzw. bakteriziden Aktivität gegenüber grampositiven Spezies und Anaerobier (*Bakteroides fragilis*, *Propionibacterium acnes*, etc). Gleichmaßen konnte durch die Fluorierung die Bioverfügbarkeit verlängert werden. Verantwortlich für die verbesserten pharmakokinetischen Eigenschaften ist im Wesentlichen die erhöhte Lipophilie des Heteroaromaten, die mit einer zunehmenden Resorption und Akkumulation sowohl innerhalb der infizierten Gewebe als auch in das Bakterium selbst einhergeht. Die Fluorchinolone zeichnen sich gegenüber den unfluorierten Chinolonen durch ein um den Faktor 10 bis 100 gesteigertes Wirkungspotential aus.

Struktur-Toxizitäts-Verhältnis: In einer Studie wurde auf die mit der C6-Fluorierung einhergehende Photo- bzw. Zytotoxizität aufmerksam gemacht. Verglichen wurden die 6-Fluorchinolone Sparfloxacin und Lomefloxacin, die nachweislich photo- und photogenotoxische Eigenschaften besitzen, mit den neu entwickelten 6-Desfluorchinolonen. Diese waren durch ein erheblich geringeres phototoxisches Potential charakterisiert. Die zellschädigenden Eigenschaften werden wahrscheinlich durch die intermediäre Freisetzung reaktiver Radikale ausgelöst (Miolo et al., 2002).

d) **C7-Position:**

Struktur-Wirkungs-Verhältnis: Diese Position hat sich im Hinblick auf die bakterizide Potenz, das antibakterielle Spektrum und die Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften besonders bewährt (Andersson und MacGowan, 2003; Mitscher und Ma, 2003). Die Substitution der C7-Position mit basischen Heterozyklen, hauptsächlich mit Piperazin- und Pyrrolidin-Derivaten, beeinflusst die acidobasischen Eigenschaften der Fluorchinolone, die unter physiologischen Bedingungen vorwiegend als neutrale Zwitterionen vorliegen. Der Ersatz der 3-Methylpiperazyl-Gruppe durch einen hydrierten 6*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-Substituenten, realisiert bei Moxifloxacin, verleiht dem resultierenden Arzneistoff eine höhere Aktivität gegenüber grampositiven Bakterien (mindestens um das 10fache) und gleichzeitig eine längere Bioverfügbarkeit (Petersen, 2001).

Struktur-Toxizitäts-Verhältnis: Die basischen ungesättigten Substituenten zeigen neben ihrer antibakteriellen Potenz gleichermaßen unerwünschte Wirkungen, die in einem ursächlichen Zusammenhang mit Arzneimittel-Interaktionen stehen. Die Wechselwirkung mit Medikamenten, deren Metabolismus über spezifische Cytochrom P450-abhängige Monoxygenase-Subformen (CYP1A2, CYP3A4, etc.) erfolgt (Theopyllin bzw. Methylxanthine, Sulfonylharnstoff-Derivate, etc.), wird durch die kompetitive Verdrängung dieser Arzneistoffe von der Monoxygenase-Bindungsstelle verursacht (Holzgrave, 2000). Ofloxacin und Lomefloxacin scheinen dabei nur minimale Effekte auf dem Xanthin-Metabolismus auszuüben, während sich die Co-Medikation von Enoxacin bzw. Ciprofloxacin mit Methylxanthinen stärker auswirkt. Um die Affinität der Chinolone zu dem Enzymsystem zu reduzieren, haben sich räumlich anspruchsvolle Substituenten in der C7-Position bewährt, welche die spezifische Bindungsposition sterisch abschirmen. Durch diese Struktur-Modifizierung war es gleichzeitig möglich, die Bindungsaffinität der 4-Chinolone zu dem GABA-ergen Rezeptor der Subform A, der in dem Zentralnervensystem, den α - und β -Zellen des endokrinen Pankreas (Dong et al., 2006) sowie anderen Gewebearten exprimiert wird, zu minimieren. Auf diese Weise gelang es, die ZNS-Toxizität, die sich zum Beispiel durch Kopfschmerzen, Benommenheit und Konvulsionen äußert, bei den Vertretern der neueren Generationen zu limitierten (Stahlmann und Riecke, 2001).

e) **C8-Position:**

Struktur-Wirkungs-Verhältnis: Die Integration eines weiteren Halogens, vorzugsweise eines Chloratoms, in das Substitutionsprofil des 4-Chinolon-Grundgerüsts korreliert mit einer signifikanten Steigerung der bakteriziden Potenz und einer Erweiterung des Wirkungsspektrums in den anaeroben Bereich. Fukuda et al. zeigten in ihren Studien, dass die Präsenz einer Methoxy-Funktion die Überwindung manifester Fluorchinolon-Resistenzen ermöglicht und darüber hinaus die Selektierungsrate von resistenten Bakterien-Stämmen wesentlich verringert (Fukuda et al., 2001). Auf pharmakokinetischer Ebene führt die mit dieser Strukturmodifizierung einhergehende Erhöhung der Lipophilie zu einer erhöhten systemischen Verfügbarkeit, so dass die Verringerung der Dosierfrequenz auf eine einzige Tagesdosis realisierbar wurde (Schaumann und Rodloff, 2007).

Struktur-Toxizitäts-Verhältnis: Die mit der Halogenierung korrelierende effizientere Bakterizidie steht gleichzeitig in einem Zusammenhang mit phototoxischen und photokarzinogenen Effekten (Christ und Kemmler, 2001; Domagala, 1994; Klecak et al., 1997). Das phototoxische Potential ist bei den Fluorchinolonen Sparfloxacin und Lomefloxacin

stärker ausgeprägt als bei den in der C8-Position unhalogenierten Fluorchinolonen (Owens und Ambrose, 2005). Die Substitution des Halogenatoms durch eine Methoxy-Gruppe führte zu einer höheren Stabilität der Fluorchinolone und reduzierte gleichzeitig das Gefährdungspotential für photochemische Reaktionen (Mitscher, 2005), ohne die bakterizide Wirkung nennenswert zu beeinträchtigen. Als Beispiel sei hier Moxifloxacin zu nennen, dessen Leitsubstanz, ein 8-Fluorchinolon, aufgrund der unerwünschten Phototoxizität nicht die Zulassung erlangt hat (Stahlmann, 2002).

f) Chiralität der Chinolone:

Die Position und räumliche Orientierung des Chiralitätszentrums innerhalb der Molekülstruktur sowie dessen Distanz zu dem Chinolon-Ringsystem beeinflussen sowohl die physikochemischen Eigenschaften als auch die antibakterielle Potenz der Chinolone in einem erheblichen Maße (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005). Evident wurde dieser Zusammenhang bei der Synthese des Fluorchinolons Ofloxacin, die basierend auf der Anellierung des 4-Chinolon-Ringsystems mit einem partiell hydrierten Heteroaromaten zu einem optisch aktiven Chinolon mit planaren Eigenschaften geführt hat. Das eingeführte Chiralitätszentrum befindet sich direkt in der meta-Stellung zu der prioritätsbestimmenden Carboxyl-Funktion des 4-Chinolons. Das aus dem Racemat Ofloxacin isolierte S-(-)-Enantiomer, Levofloxacin, ist durch eine 8- bis sogar 12-fach höhere Wirksamkeit gegenüber bakteriellen Erregern als die Antipode charakterisiert. Ein größerer Abstand des chiralen Zentrums von dem Ringsystem übt demgegenüber keinen begünstigenden Einfluss auf die antibakteriellen Eigenschaften aus (Petersen, 2001). Pazufloxacin, ebenfalls ein reines S-(-)-Enantiomer, leitet sich von Levofloxacin ab, besitzt jedoch durch den Austausch der C7-Piperazyl-Gruppierung durch einen Aminocyclopropyl-Substituenten eine geringere antibakterielle Potenz.

1.1.4 Spezifische Toxizität der Fluorchinolone

Obgleich die Fluorchinolone eine hohe Selektivität gegenüber den bakteriellen Topoisomerase-Subformen der Klasse II aufweisen (Drlica und Hooper, 2003; Mitscher, 2005), induzieren einzelne Vertreter sowohl unspezifische als auch spezifische zytotoxische Effekte. Einige Fluorchinolone, *i.e.* Temafloxacin, Tosufloxacin, Trovafloxacin, Grepafloxacin und Clinafloxacin, verursachen mit erhöhter Inzidenz reversible bzw. irreversible Schädigungen des Makroorganismus, die unter ungünstigen Bedingungen bereits zu letalen Folgen geführt haben (Andersson und MacGowan, 2003; Rubinstein, 2000; Stahlmann und Lode, 1999; von Keutz und Christ, 1998). Die Mechanismen der zytotoxischen

Eigenschaften, von denen die wichtigsten im Folgenden vorgestellt werden, konnten in einigen Fällen auf Interaktionen mit spezifischen Rezeptor-Proteinen, Enzymsystemen oder speziellen Ionen-Kanälen des Makroorganismus zurückgeführt werden, wohingegen andere Effekte, insbesondere die immunologisch abgeleitete Toxizität (Owens und Ambrose, 2005), bisher nicht aufgeklärt werden konnten.

a) Zytotoxische Eigenschaften:

Affinitäten zu der Topoisomerase II der Säuge-tierzellen sowie den Zellen des retikuloendothelialen Systems sind für genotoxische und zytotoxische Wirkungen ursächlich (Owens und Ambrose, 2005; von Keutz und Christ, 2003). Als weitere Zielstruktur ist die DNA selbst anzusehen, die durch Interaktionen mit den radikalischen Intermediaten der photogenotoxischen Fluorchinolone Lomefloxacin und Sparfloxacin irreversible Defekte erfährt (von Keutz und Christ, 2003). Die Hersteller empfehlen aus diesem Grund die Durchführung regelmäßiger Blutuntersuchungen, da in einigen Fällen (Inzidenz 0,5-5,3 %) Thrombo- und Leukopenien sowie hämolytische Anämien und akute Pankreatitiden beobachtet wurden (Owens und Ambrose, 2005). Temafloxacin musste aus diesem Grund und aufgrund der nachweislichen Induktion von Vaskulitiden, verbunden mit mikroangiopathischen Anämien, zurückgerufen werden. Das Versagen multipler physiologischer Systeme ist unter der Bezeichnung „Temafloxacin-Syndrom“ bekannt geworden (Blum et al., 1994; Holzgrabe, 2000).

b) Kardiotoxizität und Verlängerung des QT-Intervalls:

Besonders eingehend wurden die Wirkungen der Fluorchinolone auf das kardiovaskuläre System untersucht. So konnten Tierversuche eine Dosis-abhängige Senkung des systolischen und des diastolischen Blutdruckes belegen. Weitaus schwerwiegendere Folgen resultierten durch die Fluorchinolon-induzierte Verlängerung des QT-Intervalls für den menschlichen Organismus (Bischoff et al., 2000; Kang et al., 2001; Falagas et al., 2007). Im Falle der methoxylierten Fluorchinolone Moxifloxacin und Gatifloxacin sind die kardiotoxischen Effekte durch Arrhythmien, signifikante QT-Verlängerungen sowie Torsade-de-point-Arrhythmien, die mit einigen Todesfällen assoziiert wurden, in Erscheinung getreten (Burgmann, 2007; Dale et al., 2007). Als ursächlicher Mechanismus wird die Inhibierung des humanen K_{HERG} -Kanals der Cardiomyozyten und die dadurch bedingte Antagonisierung des repolarisierenden Ausstroms von K^+ -Ionen angesehen (Anderson et al., 2001; Bischoff et al., 2000; Kang et al., 2001). Als deutliche Verlängerung des QT-Intervalls wird eine Steigerung der Normwerte um 15% (> 60 ms) gewertet, da die Länge dieses Intervalls

geschlechtsspezifischen sowie interindividuellen Schwankungen unterliegt. Insbesondere planare, in der C5-Position (Grepafloxacin) modifizierte und in der C8-Position halogenierte Fluorchinolone (Sparfloxacin) offenbarten in *patch clamp*-Messungen und in *in vivo*-Untersuchungen (Sato et al., 2000) eine effektive Inhibierung des K_{HERG} -Kanals (Kang et al., 2001).

c) Störungen der Glucose-Homöostase:

Protrahierte Hypoglykämien, diabetische Ketoazidosen sowie hyper- als auch hypoglykämische Koma-Zustände mit teilweise letalen Folgen (Fronthingham, 2005; Gurwitz, 2006; Lewis-Hall, 2006) wurden in seltenen Fällen während einer Therapie mit Fluorchinolonen beobachtet. Besonders betroffen waren Typ-2-Diabetiker höheren Alters, die gleichzeitig mit Ciprofloxacin (Lin et al., 2004; Roberge et al., 2000; Whitely et al., 1993) bzw. Gatifloxacin (Baker und Hangii, 2002; Biggs, 2003; Menzies et al., 2002) und einem Sulfonylharnstoff-Derivat, unter anderem Glibenclamid, oder anderen oralen Antidiabetika behandelt wurden. Die dysglykämischen Ereignisse scheinen in einigen Fällen auf die Beeinträchtigung des Arzneistoff-Metabolismus der hypoglykämisch wirksamen Substanzen zu basieren (Roberge et al., 2000). Störungen des Glucose-Metabolismus haben jedoch ebenso bei Patienten, die keine diabetischen Prädispositionen aufwiesen, die charakteristischen Symptome einer gestörten Glucose-Homöostase hervorgerufen (Gajjar et al., 2000b). Demzufolge wird diese unerwünschte Reaktion bereits als Klassen-Effekt der Fluorchinolone interpretiert, der sich Substanz-spezifisch mit einem divergenten Ausmaß manifestiert (Khovidhunkit und Sunthornyothin, 2004). Die in der Literatur verfügbare Datenlage wird in dem Kapitel 5.5 ausführlich dargestellt.

Unter experimentellen Bedingungen wurden für einige Fluorchinolone inhibitorische Effekte gegenüber dem ATP-sensitiven K^+ -Kanal der endokrinen B-Zellen nachgewiesen (Saraya et al., 2004; Zünkler und Wos, 2003; Zünkler et al., 2006). Messungen der Insulinsekretionsrate aus isolierten Langerhans-Inseln während der Exposition mit ausgewählten Fluorchinolonen (Pflöger, Diplomarbeit 2006; Şahin, Diplomarbeit 2007) bzw. nach der Inkubation mit unterschiedlichen Fluorchinolon-Derivaten (Maeda et al., 1996; Tomita et al., 2007) haben die Glucose-abhängige insulinotrope Wirkung bestätigt.

1.2 Regulation der Glucose-Homöostase

Die physiologische Energiebalance und Glucose-Homöostase unterliegen einem komplexen Kontrollsystem, an dem auf peripherer und zentraler Ebene zahlreiche hormonelle und neuronale Regulationsmechanismen des neuroendokrinen Systems beteiligt sind (Miller,

1981; Porte, 2006). Eine zentrale Stellung nimmt die Entero-Insulare-Regulationsachse (Unger und Eisentraut, 1969) ein, welche die wechselseitige Beziehung zwischen dem Inkretin-System (Creutzfeldt, 1979), dem vegetativen (Schuit und Pipeleers, 1986) sowie dem enteralen Nervensystem und dem endokrinen Pankreas (Ahrén et al., 1986) charakterisiert.

Das endokrine Pankreasgewebe, repräsentiert durch die Gesamtheit der erstmals 1869 von Paul Langerhans entdeckten und als Inseln definierten Zellkluster aus den Hormon-synthetisierenden und -sezernierenden α -, β - und δ -Zellen sowie den PP-Zellen (Pipeleers et al., 1985), ist für die direkte Regulation des Glucose-Plasmaspiegels und die postprandiale Glucose-Utilisation durch die insulin sensitiven Gewebe essentiell (Levin und Goldstein, 1955). Diese funktionelle Eigenschaft basiert im Wesentlichen auf der universellen Fähigkeit der pankreatischen β -Zellen, das 1926 identifizierte Hormon Insulin zu synthetisieren und als Reaktion auf einem insulinotropen Stimulus zu sezernieren. Neben den peripheren biologischen Effekten des Insulins, besitzt die hormonelle Wirkung auf das Zentralnervensystem für die Steuerung des Glucose-Metabolismus eine wichtige Funktion, an der gleichermaßen freie Fettsäuren und das von den weißen Adipozyten sezernierte Hormon Leptin einen entscheidenden Beitrag leisten (Porte et al., 2002; Schwartz et al., 1997).

Insulin nimmt ebenso für die Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes sowie die Kontrolle der Reproduktionsleistung eine Schlüsselposition ein (Bruning et al., 2000; Porte, 2006). Sowohl Insulin als auch Leptin und das Inkretin Choleszystokinin (CCK) werden in diesem Zusammenhang als negative Rückkopplungs-Signale aufgefasst, die das Ausmaß der Nahrungsaufnahme während einer Mahlzeit regulieren (Porte und Woods, 1981; Riedy et al., 1995).

Der grundlegende Mechanismus der bisher unvollständig aufgeklärten Signalkaskade, die in der Insulinsekretion kumuliert, wird in dem allgemein akzeptierten Konsensus über die Stimulus-Sekretions-Kopplung formuliert.

1.2.1 Die Stimulus-Sekretions-Kopplung

In der allgemein akzeptierten Konsensustheorie wird das derzeitige Verständnis über den Kopplungs-Mechanismus zwischen der Stimulation und der Sekretion des für die Senkung des Glucose-Plasmaspiegels essentiellen Hormons Insulin formuliert. Die ausgehend von den frühen 1960er Jahren ermittelten Resultate umfangreicher Untersuchungen sowohl der elektrophysiologischen als auch biochemischen Eigenschaften der pankreatischen β -Zelle und der Langerhans-Insel verschiedener Spezies ermöglichten die Identifizierung und Aufklärung wichtiger Schlüsselereignisse:

- 1) Die zentrale Stellung des Glucose-Metabolismus und der sukzessiven ATP-Synthese für die exozytotische Insulinsekretion (Coore und Randle, 1964; Grodsky et al., 1963) führte 1968 zu der Formulierung der „Nährstoff-Hypothese“ (Malaisse et al., 1979; Randle et al., 1968)
- 2) Die elektrische Erregbarkeit der β -Zellen, die durch ein biphasisches, oszillierendes Aktivitätsprofil charakterisiert ist (Dean und Matthews, 1970; Henquin und Meissner, 1984)
- 3) Die essentielle Bedeutung des über den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal vermittelten Ca^{2+} -Influx für die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die als unmittelbares Triggerungssignal der exozytotischen Insulinsekretion fungiert (Frankel et al., 1981; Milner und Hales, 1967; Wollheim und Sharp, 1981)

1.2.2 Der „*triggering pathway*“ der Insulinsekretion

Die regulatorischen Details und deren genaue Funktionsweisen, die der Insulinsekretion zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig entschlüsselt worden. Es gilt jedoch als gesichert, dass Glucose unter physiologischen Bedingungen den wichtigsten Stimulus der Insulinsekretion darstellt (Lenzen und Panten, 1988; Matschinsky, 1995). Die bifunktionellen Eigenschaften des Monosaccharids sind zum einen auf die Funktion als Nährstoff für die Steigerung des Energie-Metabolismus und zum anderen auf die stimulatorische Wirkung gegenüber den endokrinen β -Zellen bzw. Langerhans-Inseln zurückzuführen (Ashcroft, 1980; Meglasson und Matschinsky, 1986).

Die kritische Steigerung des Glucose-Plasmaspiegels oberhalb eines Schwellenwertes von 7 mM (Meissner und Preissler, 1979) induziert Spezies-abhängig innerhalb weniger Minuten die erste Phase der biphasischen Insulinsekretion. Dieses charakteristische Profil der Insulin-Freisetzung wird unter *in vitro*-Bedingungen beobachtet, sobald intakte, aus Nagetierorganismen (Mäuse, Ratten) isolierte Langerhans-Inseln oder Inseln humanen Ursprungs einer gesteigerten Glucose-Konzentration (≥ 7 mM) ausgesetzt werden. In Gegenwart eines solchen experimentell induzierten Rechteckimpulses wird die transiente erste Phase der Insulinsekretion mit einer schnellen Kinetik ausgelöst, während die prolongierte zweite Phase um einige Minuten verzögert einsetzt (Grodsky, 1989). In Relation zu der ersten Phase ist die Amplitude der zweiten Phase geringer ausgeprägt. Die Insulinsekretion unterliegt einer Glucose-Desensibilisierung, die nach einer mehrstündigen Glucose-Exposition zu einer progredienten Reduktion der Sekretionsrate führt (Grodsky, 1996).

In vivo-Analysen der Insulin-Konzentration in dem portalen oder peripheren Blutkreislauf sind dagegen durch ein pulsatile Sekretionsprofil gekennzeichnet, das einem zircadianen Rhythmus folgt (Henquin et al., 2002). Im Rahmen einer intravenösen Glucose-Belastung lässt sich jedoch unter *in vivo*-Bedingungen die erste Phase der Insulinsekretion nach einem Zeitraum von fünf bis zehn Minuten registrieren, an die sich nach einigen Minuten die prolongierte zweite Phase anschließt (Lillioja et al., 1993).

Neben den Aldohexosen D-Glucose und D-Mannose existieren nur wenige andere Stimulatoren, die gegenüber den β -Zellen eine insulinotrope Funktion erfüllen. Dazu zählen die Aminosäuren L-Arginin, L-Leucin (Yada, 1994) sowie deren Transaminierungsprodukt, die α -Ketoisocaproinsäure (Panten, 1975; Panten et al., 1988). Des Weiteren sind L-Glutamin (Li et al., 2004) und β -Phenylpyruvat (Lenzen und Panten, 1981), bei dem es sich um die Ketosäure der essentiellen Aminosäure L-Phenylalanin handelt, an der Nährstoff-induzierten Insulinsekretion beteiligt. Demgegenüber fungieren zahlreiche Transmitter, Hormone, Polypeptide und Metabolite sowie die *second messenger* Ca^{2+} , cAMP, DAG und IP_3 (Prentky und Matschinsky, 1987) als Modulatoren der Insulinsekretion. Definitionsgemäß sind Modulatoren der Glucose-induzierten Insulinsekretion unter substimulatorischen Bedingungen nicht in der Lage, die Insulinsekretion zu initiieren (Ashcroft und Ashcroft, 1992). Die komplexen Interaktionen dieser bioaktiven Substanzen potenzieren die insulinotropen Effekte der Stimulatoren. Dementsprechend wird das Ausmaß der Insulinsekretion und die Intensität der peripheren sowie zentralen Effekte des anabolen Hormons auf neuronalem (Acetylcholin, Noradrenalin, VIP, etc.) und hormonellem Wege (Glucagon, die Inkretine GLP-1 GIP, CCK, etc.) gesteuert und durch die Wirkungsmechanismen der Peptidhormone der entero-insularen Regulations-Achse (Enterostatin, Ghrelin, Obestatin, etc.) modifiziert (Porte, 2006).

Die Aufnahme der Glucose erfolgt über eine spezielle Isoform des Glucose-Carriers (GLUT) der pankreatischen B-Zellen. Repräsentiert wird diese durch die GLUT-2-Isoform, welche die höchste Michaelis-Menten-Konstante K_m ($K_m \sim 40 \text{ mM}$) sowie den größten V_{\max} -Wert hinsichtlich der Glucosetransportrate innerhalb der GLUT-Proteinfamilie aufweist (Oka et al., 1994). Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur erhöhte Glucose-Konzentrationen ($> 7 \text{ mM}$) zu einer Insulinsekretion führen. Gleichzeitig ist der Organismus befähigt, postprandiale Glucosespitzen innerhalb kurzer Zeit zu kompensieren. Wie in der Abbildung 1.2.2 dargestellt, wird die Glucose-Utilisation innerhalb der B-Zelle durch die Phosphorylierung des Monosaccharids zu Glucose-6-Phosphat eingeleitet. Dieser Prozess wird durch das Schlüsselenzym Glucokinase (Bedoya et al., 1986) katalysiert, deren Aktivität bei stimulatorischen Glucose-Konzentrationen ein Maximum erreicht ($K_M = 10 \text{ mM}$) (Lenzen und

Panten, 1988; Matschinsky, 1995). Bedingt durch die sigmoidale Kinetik bzw. Konzentrations-Abhängigkeit dieses Enzyms von dem Substrat Glucose, stellt dieser Prozess den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Glycolyse dar (Lenzen und Panten, 1988, Turner et al., 1979). Demgemäß reagiert dieses Enzym sehr sensibel auf Konzentrationsschwankungen des aktuellen Glucose-Plasmaspiegels in einem millimolaren Bereich und wird daher als Glucose-Sensor des glycolytischen Flux aufgefasst (Matschinsky, 1990).

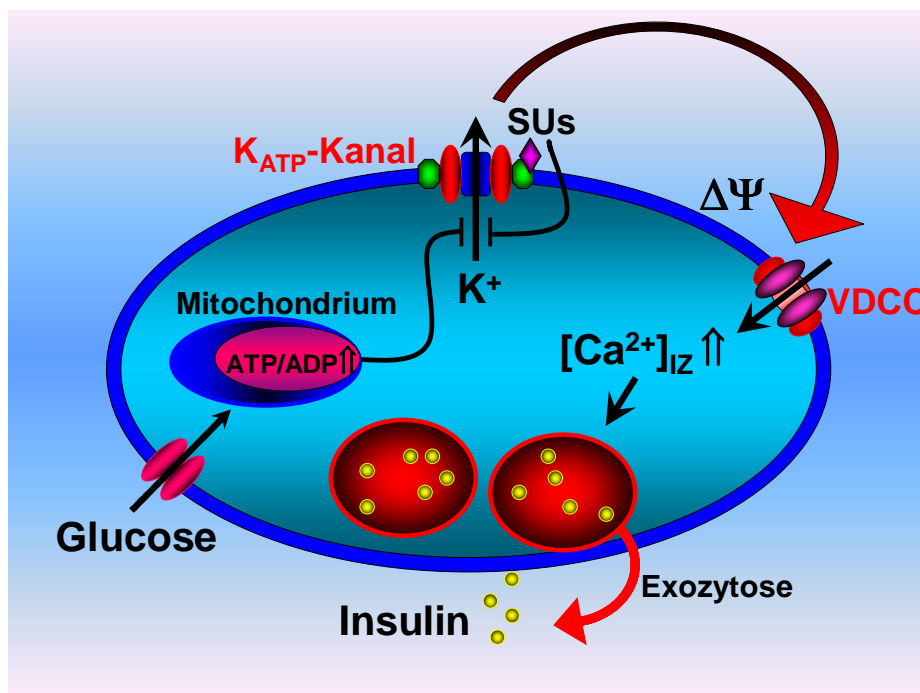


Abbildung 1.2.2 Die Stimulus-Sekretions-Kopplung gemäß der allgemein akzeptierten Konsensus-Hypothese Dargestellt ist der Mechanismus der Insulinsekretion, induziert durch das Monosaccharid Glucose oder einem Sulfonylharnstoff-Derivat (SU). Als physiologischer Initiator der Insulinsekretion dient Glucose (>7 mM), während der K_{ATP}-Kanal als Kopplungsglied zwischen dem gesteigerten Energie-Metabolismus und der elektrischen Aktivität der B-Zelle fungiert. Der kritische Anstieg der ATP/ADP-Ratio führt zu der direkten Inhibition des K_{ATP}-Kanals und leitet auf diese Weise die Depolarisation der Plasmamembran ($\Delta\Psi$) ein. Dieser Prozess induziert den Influx exogener Ca²⁺-Ionen, der vorwiegend über den Voltage-Dependent Ca²⁺ Channel (VDCC) des L-Typus vermittelt wird. Auf diese Weise akkumuliert eine effektive Ca²⁺-Konzentration (>100 μ M) innerhalb der peripheren Bereiche des Cytosols, in denen sich in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran zahlreiche insulinhaltige Speichervesikel befinden. Dies wird der Vorstellung gerecht, dass in der Initialphase der Insulinsekretion ungefähr 500 bis 700 Granula pro Sekunde durch Exozytose sezerniert werden (Barg et al., 2001; Rorsman, 1997).

Der Glucose-Metabolismus steigert durch die Initiierung der Glycolyse, die nachfolgende Freisetzung von Intermediaten und Reduktionsäquivalenten aus dem Citrat-Zyklus und die terminale oxidative Phosphorylierung innerhalb der Mitochondrien die ATP-Syntheserate, welche mit einer adäquaten Reduktion der ADP-Konzentration einhergeht. In

der Konsequenz führt die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten in dem Cytosol der B-Zelle zu der Unterschreitung eines kritischen Schwellenwertes (Henquin et al., 1994; Meglasson et al., 1989; Prentki, 1996). Dieser Prozess reduziert die Offenwahrscheinlichkeit des ATP-sensitiven K^+ -Kanals (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Hopkins et al., 1992), wobei die Hemmung der Kanalaktivität von Änderungen des Membranpotentials unabhängig ist (Dunne und Petersen, 1986; Misler et al., 1986). Die Mg^{2+} -unabhängige Bindung von einem ATP-Molekül an das spezifische Bindungsmotiv der porenbildenden $K_{IR}6.2$ -Untereinheit einer der vier $K_{IR}6.2/SUR1$ -Heterodimere des Kanals ist hinreichend (Markworth et al., 2000), um die spontan geringe Offenwahrscheinlichkeit von 6 % bis 8 % auf Werte unterhalb von 3 % zu reduzieren (Panten et al., 1990). Auf diese Weise wird die Depolarisation der Plasmamembran eingeleitet, deren Ruhepotential durch die K^+ -Gleichgewichtsströmung sowie die Aktivität des K_{ATP} -Kanals Spezies-abhängig auf einem Niveau von -60 bis -70mV determiniert wird (Antunes et al., 2000; Ashcroft und Rorsman, 1989). Der grundlegende Einwärtsstrom positiver Ladungsträger in das Zytosol, der die langsame Reduktion des Membranpotentials induziert, ist bisher unbekannter Natur (Ashcroft und Rorsman, 1989; Atwater et al., 1996).

Die Verringerung des Membranpotentials unterhalb eines kritischen Schwellenpotentials (- 50 mV) induziert die Aktivierung Spannungs-abhängiger Ca^{2+} -Kanäle (VDCC), vorwiegend des L-Typus, die den Influx extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen in die peripheren Regionen des Zytosols vermitteln (Plant, 1988). Innerhalb eines kurzen Zeitraumes resultiert eine effiziente Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, die als essentielles Triggerungssignal (Wollheim und Sharp, 1981) die exozytotische Insulinsekretion in den systemischen Kreislauf initiiert. Dieser mit einer schnellen Kinetik einsetzende Prozess wird mit der ersten Phase der zweiphasischen Insulinsekretion assoziiert (Barg et al., 2001).

Die unter experimentellen Bedingungen zu beobachtende zweite Phase der Glucose-induzierten Insulinsekretion ist demgegenüber durch eine prolongierte Insulinsekretion gekennzeichnet. Einigen Theorien zufolge (Maechler und Wollheim, 1999; Rorsman und Renström, 1999) basiert die erste Phase auf der ATP-unabhängigen Exozytose des so genannten „*immediately releasable pool*“, wohingegen die verzögert einsetzende Sekretionsphase auf die ATP-abhängige Mobilisierung zentral lokalisierter Speichervesikel zurückgeführt wird (Barg et al., 2001), die in den peripheren Bereichen der Regeneration des erschöpften, unmittelbar verfügbaren Insulin-Pools dienen (Bokvist et al., 1995).

Die erwähnte bifunktionelle Eigenschaft des Substrates Glucose - sowohl als Nährstoff als auch als Stimulus bzw. indirekter Transkriptionsfaktor - äußert sich durch die

Steigerung der Expressionsrate zahlreicher Gene der endokrinen B-Zelle, die Erhöhung der Insulin-Syntheseleistung und die Förderung der Zellproliferation (Leibiger et al., 2002; Melloul et al., 2002).

1.2.3 Die Bedeutung des K_{ATP} -Kanals als Transformator der biochemischen Signale in adäquate elektrische Reize

Der ATP-sensitive K^+ -Kanal nimmt gemäß der Konsensustheorie eine Schlüsselposition in dem Konzept der Stimulus-Sekretions-Kopplung ein, die sich durch die Sensibilität des heterotetrameren K^+ -Kanals gegenüber den Adenin-Nukleotiden ATP und ADP sowie weiteren Nukleotiden des Zytosols (GTP, GDP, cAMP, etc.) begründet (Aguilar-Bryan et al., 1998). Unter funktionellem Aspekt handelt es sich bei dem heterotetrameren $K_{ir}6.2/SUR1$ -Kanal um einen einwärts gleichrichtenden K^+ -Kanal („*inward rectifier*“, $K_{ir}X.Y$), für dessen Pore - konstituiert durch vier $K_{ir}6.2$ -Untereinheiten - eine hohe K^+ -Selektivität kennzeichnend ist (Aguilar-Bryan et al., 1998; Ashcroft und Rorsman, 1989). Der Terminus „*inward rectifier*“ leitet sich von der bevorzugt einwärts gerichteten K^+ -Leitfähigkeit ab (Nichols und Lopatin, 1997), die unter *in vitro*-Bedingungen bei einem negativen Membranpotential stärker ausgeprägt ist als der K^+ -Auswärtsstrom bei einem betragsgleichen Potential positiven Vorzeichens (Ashcroft und Rorsman, 1989). Dieser wird durch die spannungsabhängige Einlagerung von Mg^{2+} -Ionen, Spermidin und Spermin sowie anderer zytosolischer Polyamine innerhalb der Pore behindert (Findlay, 1987).

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt die funktionelle Aktivität des K_{ATP} -Kanals einer komplexen Regulation, die nicht ausschließlich von der ATP-Konzentration, sondern ebenso von der zytosolischen ADP- bzw. $MgADP$ -Konzentration abhängig ist. Ashcroft und Rorsman (1989) sowie Dunne et al. (1988) charakterisieren in ihren Arbeiten ein komplexes System aus ATP, ADP sowie den korrespondierenden Mg^{2+} -Komplexen dieser Nukleotide. Die resultierende ATP/ADP-Ratio reguliert die Offen- bzw. Geschlossenwahrscheinlichkeit und dementsprechend die Kinetik sowie die K^+ -Leitfähigkeit des K^+ -Kanals, der auf diese Weise das basale Membranpotential der B-Zelle auf einen Bereich von - 70 mV bis - 65 mV determiniert.

Gemäß der formulierten Nährstoff-Hypothese führt der Metabolismus des primären Substrates Glucose zu der Synthese einer adäquaten Menge an Reduktionsäquivalenten und ATP, das in Form von ATP^{4-} an die $K_{ir}6.2$ -Untereinheit des Kanals bindet (Ashcroft and Gribble, 1999). ATP ist demzufolge als direkter Inhibitor des K_{ATP} -Kanals aufzufassen (Tucker et al., 1997; Ueda, 1999), der den metabolischen Zellstatus an die elektrische

Aktivität der B-Zelle koppelt. Der kritische ATP/ADP-Quotient ist über weite Konzentrationsbereiche variierbar und dadurch sehr präzise an den aktuellen Glucosestatus bzw. Energiemetabolismus adaptierbar (Ashcroft und Rorsman, 1989; Satin und Smolen, 1994).

1.2.4 Der „*amplifying pathway*“ der Insulinsekretion

Neben diesem in der Konsensushypothese formulierten K_{ATP} -Kanal-abhängigen Kopplungsmechanismus, definiert als „*triggering pathway*“, existiert ein weiterer Signalweg. Dieser wird aufgrund der potenzierenden Wirkung auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion (Henquin, 2000) als „*amplifying pathway*“ interpretiert (Best, 2002), der sich auf distaler Ebene des Glucose-Metabolismus manifestiert. Die weitgehend unbekannte Signalkaskade ist direkt an den Energiestoffwechsel der B-Zelle gekoppelt und wird in Kombination mit dem „*triggering pathway*“ für die biphasische Glucose-induzierte Insulinsekretion verantwortlich gemacht (Komatsu et al., 1997). Voraussetzung für eine effektive Amplifizierung ist aus diesem Grund die Erhöhung des ATP/ADP-Quotienten, die zu einer Intensivierung des mitochondrialen Energiemetabolismus führt (Gembal et al., 1993).

Ebenso besitzt das Inkretin-System (Creutzfeldt, 1979) eine bedeutende Funktion für die effektive Potenzierung der Insulinsekretion. Als Inkretine werden Hormone aufgefasst, die während der Digestion oraler Glucose-Gaben oder anderer Nährstoffe aus spezifischen Zellen des Gastrointestinaltraktes sezerniert werden und Glucose-selektiv die Insulinsekretion amplifizieren. Das *glucagon-like peptide 1* (GLP-1) sowie das *glucose-dependent insulin-releasing peptide* (GIP) repräsentieren derzeit die am intensivsten charakterisierten Inkretine. Der Inkretin-Effekt ist in Abhängigkeit von der Menge und der Zusammensetzung der Nahrung zu 20 % bis maximal 60 % an der postprandialen Insulin-Sekretion beteiligt (Meier und Nauck, 2005). GLP-1-Analoga, unter anderem Exenatid (Byetta®) (Musch und Heinzl, 2006), und Inhibitoren der Depeptidyl-Peptidase IV (Vildagliptin und Sitagliptin) (Ahrén, 2005; Bergmann et al., 2005), einem Enzym, das für die Konvertierung der Inkretine GLP-1 und GIP in die inaktive Form verantwortlich ist, werden als neuartige therapeutische Interventionen des Typ II-Diabetes bereits eingesetzt oder befinden sich in der klinischen Phase II (Drucker und Nauck, 2006).

Zahlreiche Transmitter, Polypeptide und Metabolite sowie *second messenger* fungieren in der Gesamtheit als Modulatoren der Insulinsekretion, welche die insulinotropen Effekte der Stimulatoren potenzieren (Ashcroft und Ashcroft, 1992; Ashcroft und Rorsman, 1989) und gleichzeitig auf neuronalem (Acetylcholin, ATP, VIP, etc.) und hormonellem (Glucagon, GLP-1, GIP, CCK, Leptin, etc.) Wege modifizieren. Da die Amplifikation die

zytosolische Ca^{2+} -Konzentration nicht zusätzlich erhöht (Gembal et al. 1993), scheint die triggernde Wirkung der Ca^{2+} -Ionen sowohl auf das Exozytose-System als auch gegenüber dem Metabolismus optimiert zu werden (Jonas et al. 1998). Dabei spielen Proteinkinasen (PKA, PKC, etc.) sowie durch Phospholipasen katalysierte Phosphorylierungsprozesse (PLC β , PLA $_2$, etc.) eine bedeutende Rolle (Jones und Persaud, 1998).

1.2.5 Der K_{ATP} -Kanal-unabhängige Signalmechanismus

In der Vergangenheit wurde evident, dass bei einer vollständigen Inaktivierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals Glucose weiterhin in der Lage ist, die Insulinsekretion zu stimulieren (Henquin, 2000; Panten et al., 1988). Die Entwicklung transgener Tiermodelle, deren endokrine B-Zellen infolge eines SUR1-*knock out* bzw. $\text{K}_{\text{ir}}6.2$ -*knock out* keine funktionellen K_{ATP} -Kanäle exprimieren, hat die Existenz eines unabhängigen Signalmechanismus bestätigt (Nenquin et al., 2004; Seghers et al., 2000). Die K_{ATP} -unabhängige Insulin-Freisetzung basiert auf dem Glucosestoffwechsel innerhalb der B-Zellen (Gembal et al., 1992; Henquin, 2000; Liu et al., 2003) und damit einhergehend auf der Synthese von ATP und anderer Nukleotide sowie bisher unbekannter Intermediate, die zu einer Intensivierung des Energiestoffwechsels innerhalb der Mitochondrien führen (Komatsu et al., 1997; Maechler und Wollheim, 1999). Ursprünglich wurde angenommen, dass L-Glutamat eine derartige Schlüsselposition einnimmt. In den B-Zellen erfüllt das aus dem mitochondrialen Metabolismus resultierende L-Glutamat eine bidirektionale Funktion sowohl als Stimulator der Insulinsekretion als auch als *second messenger* (Maechler und Wollheim, 1999). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer Mediatorfunktion und der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Insulinsekretion konnte jedoch in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden (Bertrand et al., 2002; MacDonald und Fahien, 2000).

Eine bedeutende Stellung wird jedoch dem α -Ketoglutarat zugesprochen, das unter anderem durch die oxidative Desaminierung aus L-Glutamat generiert wird (Lenzen et al., 1986). Hervorzuheben sind ebenso die Intermediate D-Glyceraldehyd und α -Ketoisocapronat, deren amplifizierende Wirkung gegenüber der Insulinsekretion bei vollständig inaktivierten K_{ATP} -Kanälen nachgewiesen wurde (Panten et al., 1988). Der beschriebene K_{ATP} -Kanal-unabhängige Signalweg ist jedoch nicht autonom organisiert, sondern auf die K_{ATP} -Kanal-basierende Stimulus-Sekretions-Kopplung angewiesen (Henquin, 2000). Dies äußert sich durch die Abhängigkeit des amplifizierenden Signals von einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, die unter physiologischen Bedingungen über die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals vermittelt wird (Gembal et al., 1993; Henquin, 2000).

1.2.6 Verhältnis zwischen den zytosolischen Ca^{2+} -Signalmechanismen und der Glucose-induzierten Insulinsekretion

Die Glucose-induzierte Insulinsekretion korreliert gemäß der Stimulus-Sekretions-Kopplung mit einer kritischen Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), die sich als charakteristisch oszillierendes Signal mit unterschiedlicher Kinetik manifestiert (Hellman et al., 1992). In zahlreichen Untersuchungen wurde ein triphasisches $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalprofil registriert (Grapengiesser et al., 1988), einem Ausdruck für die komplexe Regulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf extra- und intrazellulärer Ebene (Liu et al., 1998; Prentki und Matschinsky, 1987; Wollheim und Sharp, 1987).

Durch den Einsatz fluoreszenzoptischer Verfahren, vor allem der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie, lassen sich unter substimulatorischen Bedingungen (3 mM bis 5 mM Glucose) periodisch fluktuierende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale registrieren (Gylfe, 1988). Basierend auf der geringen Frequenz (0,1 bis 0,5 min^{-1}) werden diese $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen als „*slow waves*“ definiert (Hellman et al., 1992), deren Frequenz und zeitliche Dauer infolge einer progressiven Stimulation (>7 mM Glucose) gesteigert werden (Santos et al., 2000). Die Überschreitung eines kritischen Konzentrationsbereiches induziert, nach einer initialen Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalintensität, die Überlagerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen durch transiente $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale, den so genannten „ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -*spikes*“ (Grapengiesser et al., 1988). Als Mechanismus des triphasischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalprofils wird postuliert, dass die initial verminderte Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen in dem Zyotosol durch die ATP-induzierte Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase des Endoplasmatischen Retikulums (SERCA) hervorgerufen wird (Gylfe, 1989). Die mit einer geringen Kinetik oszillierenden *slow waves* werden hingegen durch die periodische Aktivität der Spannungs-abhängigen Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) der Plasmamembran generiert (Hellman et al., 1992), während die transienten Ca^{2+} -*spikes* primär auf die IP_3 -kontrollierte Mobilisierung intrazellulär gespeicherter Ca^{2+} -Ionen zurückzuführen sind.

Relationen zwischen dem pulsatilen Profil der Insulinsekretion und den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen lassen eine Synchronizität der periodischen Fluktuationen erkennen (Gilon et al., 1993), die gleichermaßen für die Kinetik des oszillierenden Membranpotentials elektrisch aktiver B-Zellen nachgewiesen wurde (Santos et al., 1991). Sowohl die Frequenz als auch die zeitliche Dauer der Oszillationen werden auf allen drei Ebenen durch die Glucose-Konzentration und implizit den Energie-Metabolismus modifiziert: Die Frequenz der alternierenden Phasen aus Depolarisation („*burst*“) und Repolarisation („*interburst*“) wird proportional mit steigender Glucose-Konzentration zu Gunsten der Ca^{2+} -getragenen Aktionspotentiale gesteigert; gleichzeitig werden die Phasen elektrischer Inaktivität verkürzt (Satin

und Cook, 1989). Meissner und Schmelz (1974) zeigten in ihren elektrophysiologischen Untersuchungen, dass eine extrazelluläre Glucose-Konzentration von 5 mM bis 7 mM hinreichend ist, um das Schwellenpotential von -50 mM der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle zu unterschreiten. In Gegenwart einer Glucose-Konzentration von nahezu 20 mM erfährt die B-Zelle durch die vollständige Suppression der *interburst*-Phasen eine permanente Depolarisation mit kontinuierlich einsetzenden Ca^{2+} -spikes. Dieser Sachverhalt verdeutlicht die zentrale Funktion der Ca^{2+} -Ionen für die Transformation der elektrischen Aktivität in eine adäquate Insulinsekretionsrate. Im Gegensatz zu den isolierten B-Zellen weisen Zellassoziate aus mindestens vier Einzelzellen oder intakte Pankreasinseln synchronisierte Oszillationen des Membranpotentials und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale auf (Bergsten et al., 1994; Gilon et al., 2002; Meissner, 1976). Dieses Phänomen wird auf die elektrische Kopplung der endokrinen Zellen über *gap junctions* und die dadurch bedingte interzelluläre Kommunikation innerhalb der Zellassoziate zurückgeführt. In Erwägung wird dabei auch die Beteiligung intrainsularer Steuerungsmechanismen gezogen, die auf hormonellen und neuronalen Einflüssen des Inkretin-Systems und des vegetativen Nervations moduliert werden.

1.2.7 Die Exozytose der Sekretgranula

Die erhöhte Verfügbarkeit freier Ca^{2+} -Ionen in dem Zytosol induziert die exozytotische Insulinsekretion. Gemäß der ursprünglich für die neuronale Exozytose formulierten „SNARE“-Hypothese (Sollner et al., 1993), wird dieser Prozess durch die Aktivierung des so genannten „Exozytose-Apparates“ ausgelöst. Die in den membrannahen Regionen (aktive Zonen) akkumulierten Ca^{2+} -Ionen (Rorsman et al., 1994) interagieren mit spezifischen Proteinen (SNAP-25, Syntaxin, Synaptobrevin, etc.), wobei in der initialen Phase die membranären t-SNARE-Proteine Syntaxin-1 und SNAP-25 (Nagamatsu et al., 1999) mit speziellen v-SNARE-Proteinen der Vesikelmembran den Exozytose-Apparat konstituieren. Der prolongierte Ca^{2+} -Influx in die Zelle initiiert über den so genannten Ca^{2+} -Sensor Synaptotagmin die Fusion der Speichervesikel mit der Plasmamembran und implizit die Insulinsekretion in den Extrazellulärraum. Der Einsatz des Fluorochroms Quinacrin in Fluoreszenzmessungen führte zu der Bestätigung, dass die Speichervesikel in einer hohen Dichte innerhalb der membrannahen Bereiche lokalisiert sind und einen „unmittelbar freisetzbaren Speicherpool“ bilden (Bokvist et al., 1995; Barg et al., 2001). Daneben existiert in den zentralen Regionen der B-Zelle ein „nicht-unmittelbar sezernierbarer Speicherpool“, dessen Vesikel energieabhängig durch so genanntes „*priming*“ und „*docking*“ rekrutiert und in den aktivierten Zustand konvertiert werden (Barg, 2003; Detimary et al., 1994).

2. Fragestellung und Zielsetzung

Für einige Substanzen aus der Klasse der antibiotisch wirksamen Fluorchinolone, unter anderem Lomefloxacin, Ciprofloxacin, Temafloxacin und Gatifloxacin, sind Störungen der Glucose-Homöostase als unerwünschte Arzneimittelwirkung mit schwerwiegenden Folgen nachgewiesen worden. Es wurden sowohl Hypo- als auch Hyperglykämien verursacht, die in einigen Fällen zum Tode der Patienten geführt haben. Neben Interaktionen mit oralen Antidiabetika, wird eine direkte Steigerung der Insulinsekretion als auslösender Mechanismus vermutet. Für die Induktion hypoglykämischer Ereignisse könnte die bekannte Fähigkeit einiger Fluorchinolon-Derivate, den ATP-sensitiven K^+ -Kanal der pankreatischen B-Zellen zu inaktivieren, ursächlich sein; die hyperglykämische Entgleisung des Glucose-Metabolismus und die strukturellen Veränderungen der B-Zellen werden jedoch durch diesen Prozess nicht erklärt.

Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Wirkung ausgewählter Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration analysiert werden, da dieser Parameter unmittelbar für die kurzfristige Regulation der Insulinsekretion als auch die längerfristige Funktionsänderung auf distaler Ebene des Zell-Metabolismus relevant ist. Aufgrund der Interferenz zwischen der endogenen Fluoreszenz der Fluorchinolone und der Fluoreszenzemission des ratiometrischen Ca^{2+} -Indikators Fura-2 war es erforderlich, ein Korrekturverfahren zu entwickeln, das die Dissoziation zwischen der intrinsischen Fluoreszenz der Testsubstanzen und der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzemission des Indikators erlaubte. Als weitere Fragestellung wurde geprüft, ob sich die beobachteten Effekte gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals zurückführen lassen. Dies erfolgte durch die elektrophysiologische Charakterisierung der depolarisierenden Wirkung der Fluorchinolone in der *whole cell*-Konfiguration. Um die Bedeutung der K_{ATP} -Kanal-Inaktivierung als Voraussetzung für die Fluorchinolon-induzierte Steigerung der Insulinsekretion beurteilen zu können, wurde darüber hinaus die Wirkung der Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration K_{ATP} -Kanal-defizienter B-Zellen der SUR1-*knock out*-Maus analysiert.

Basierend auf dieser Grundlage wurden Korrelationen zwischen den Literaturdaten und den betazytotropen Eigenschaften therapeutisch relevanter Fluorchinolone unter *in vitro*-Bedingungen untersucht. Für die Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung, die für die Entwicklung zukünftiger Fluorchinolon-Derivate ohne hypoglykämische Eigenschaften

bedeutungsvoll ist, wurden congenere, in der N1-Position Fluorphenyl-substituierte Fluorchinolone in die Untersuchungen einbezogen, die geringgradige Varianzen des Substitutionsprofils in der N1- und der C7-Position aufweisen. Ergänzt wurde die Analyse des Struktur-Wirkungs-Verhältnisses durch semiempirische Berechnungen der Molekülgeometrie, Konformationsanalysen und Berechnungen des elektrostatischen Potentials.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Lösungen und Medien

3.1.1 Basismedium für die Isolation der Langerhans-Inseln und der endokrinen B-Zellen (Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, KRHP)

Als Basismedium sowohl für die Isolation und die Präparation der Langerhans-Inseln als auch die nachfolgende Dissoziation in die einzelnen B-Zellen diente die modifizierte Form eines HEPES-substituierten Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffers, im Folgenden als KRHP bezeichnet. Die zugesetzte HEPES-Lösung diente der Kohlenstoff-Fixierung, um über einen längeren Zeitraum einen konstanten pH-Wert von 7,4 gewährleisten zu können. Bereits 1974 zeigte Lernmark in seinen Arbeiten, dass die Substitution eines adäquaten Anteils der erforderlichen Bicarbonat-Konzentration durch den nichtflüchtigen organischen HEPES-Puffer die Alkalisierung des Mediums infolge der Freisetzung von leicht flüchtigem CO₂ verhindert (Lernmark, 1974).

Für die Herstellung von 2000 ml des Bicarbonat-Puffers wurden die folgenden organischen Substanzen und anorganischen Salze eingewogen und in bidestilliertem Wasser gelöst:

	Endkonzentration
a) 752,74 mg Calciumchlorid-Dihydrat <i>p.a.</i> (6404, Fa. Merck)	(2,56 mM)
b) 700,77 mg Kaliumchlorid <i>p.a.</i> (4936, Fa. Merck)	(4,7 mM)
c) 326,26 mg Kaliumhydrogenphosphat <i>p.a.</i> (4873, Fa. Merck)	(1,2 mM)
d) 591,55 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat <i>p.a.</i> (5886, Fa. Merck)	(1,2 mM)
e) 13,441 g Natriumchlorid <i>p.a.</i> (6404, Fa. Merck)	(115 mM)
f) 3,360 g Natriumhydrogencarbonat <i>p.a.</i> (6329, Fa. Merck)	(20 mM)
g) 1,982 g D-Glucose-Monohydrat <i>p.a.</i> (1.08342, Fa. Merck)	(5 mM)
h) 4,766 g HEPES (91053, Fa. Roth)	(10 mM)
i) 2,000 g Albumin (11930, Fa. Serva)	(0,1 % (m/V))

Das Albumin wurde zuletzt zugesetzt, um eine übermäßige Schaumentwicklung während des mechanisch unterstützten Lösungsprozesses zu vermeiden. Der pH-Wert des resultierenden KRHP wurde mit Hilfe einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung auf einen Wert von 7,4 eingestellt und einer Sterilfiltration unterzogen (Prefilter: 13400-130-K; Hauptfilter: 11107-142-G, Fa. Sartorius). Die Lagerung des in sterilen Gefäßen zu 200 ml portionierten Bicarbonat-Puffers erfolgte bei einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C über einen Zeitraum von

maximal vier Wochen. Vor jeder Zellpräparation wurde der KRHP auf nahezu 18 °C temperiert und der pH-Wert durch den Zusatz einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung auf einen Wert von 7,4 äquilibriert.

3.1.2 Lösungen der Zellisolierung und Kulturmedien

3.1.2.1 1 N bzw. 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung

39,99 g Natriumhydroxid-Plättchen (6462, Fa. Merck) wurden in einem Volumen von 1000 ml Aqua bidest. vollständig gelöst. Die Herstellung der gewünschten 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung erfolgte durch die Verdünnung von 100 ml der 1 N Stammlösung auf das erforderliche Endvolumen von 1000 ml.

3.1.2.2 Collagenase P-Lösung

In Abhängigkeit von der Aktivität der verwendeten Collagenase-Chargen wurden 0,5 mg bis maximal 1,0 mg Collagenase P (Collagenase P, Testchargen der Fa. Roche Diagnostics, ehemals Boehringer Mannheim) pro ml Lösung eingesetzt. Um eine hohe Stabilität zu gewährleisten, wurde das Enzym bei einer Temperatur von 2 °C gelagert und unmittelbar vor der Zellpräparation in dem entsprechenden Volumen des unter 3.1.1 definierten KRHP gelöst. Die resultierende Collagenase P-Lösung wurde bis zu dem Zeitpunkt der Injektion auf Eis gelagert.

3.1.2.3 Ca^{2+} -freie Lösung für die Dissoziation der isolierten Langerhans-Inseln in die einzelnen B-Zellen

Die Herstellung des Ca^{2+} -freien Mediums orientierte sich weitgehend an die Zusammensetzung des unter 3.1.1. beschriebenen Bicarbonat-Puffers, enthielt jedoch als Ca^{2+} -Komplexbildner zusätzlich den Chelator EGTA. Für die Zubereitung von 100 ml der auf einem pH-Wert von 7,4 äquilibrierten Lösung wurden die folgenden Salze und organischen Substanzen in der genannten Reihenfolge eingewogen und in Aqua bidest. vollständig gelöst:

	Endkonzentration
a) 35,78 mg Kaliumchlorid <i>p.a.</i> (4936, Fa. Merck)	(4,8 mM)
b) 16,33 mg Kaliumhydrogenphosphat <i>p.a.</i> (4873, Fa. Merck)	(1,2 mM)
c) 29,58 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat <i>p.a.</i> (5886, Fa. Merck)	(1,2 mM)
d) 788,94 mg Natriumchlorid <i>p.a.</i> (6404, Fa. Roth)	(135 mM)
e) 19,02 mg EGTA <i>p.a.</i> (11290, Fa. Sigma)	(0,5 mM)
f) 595,78 mg HEPES (91053, Fa. Roth)	(25 mM)

g) 1000,00 mg Albumin (11930, Fa. Serva) (0,1 % (m/V))

Die Einstellung des pH-Wertes, die erforderliche Sterilfiltration und die Lagerung des Mediums erfolgten in der gleichen Weise wie unter 3.1.1 erläutert.

3.1.2.4 Collagen-Lösung für die Präparation der Deckgläschen

Für die Herstellung eines Volumens von 2000 µl der Collagen-Lösung wurden 1,0 mg Collagen (Typ 1, C7661, Fa. Sigma) in einem sterilen, verschließbaren Glasgefäß eingewogen. Das entsprechende Volumen des Lösungsmittels, einer 0,2-prozentigen Essigsäure, wurde unmittelbar vor der Überführung in das Gefäß sterilfiltriert (Filtropur S plus 1,2, Fa. Sarstedt). Um die Löslichkeit des Proteins zu fördern, wurde das Medium für ungefähr zehn Minuten in einem Ultraschallbad behandelt. Die resultierende essigsaure Collagen-Lösung wurde bei einer Temperatur von 4 °C gelagert und konnte innerhalb von vier Wochen für die Kultivierung der Pankreasinseln auf Deckgläschen verwendet werden.

3.1.3 Nährmedien für die Kultivierung der isolierten B-Zellen

3.1.3.1 Kulturmedium RPMI 1640, modifiziert mit 10 mM Glucose

Während der initialen Adhäsionsphase der isolierten Langerhans-Inseln bzw. dissoziierten B-Zellen wurde das konventionelle RPMI 1640-Nährmedium verwendet, das anorganische Nährsalze und Puffersysteme, Vitamine, Provitamine, essentielle Aminosäuren sowie zusätzlich 10 mM D-Glucose, Phenolrot und Glutathion enthält. Das Medium wurde ebenfalls für die Kultivierung der nach dem Verfahren der direkten Collagenase-Injektion (s. Kap. 3.3.2) isolierten B-Zellen eingesetzt.

52,0 g der RPMI 1640-Trockensubstanz (Cat-No. T 121-10, w L-Glutamine, Fa. Seromed) wurden zusammen mit 10,0 g Natriumhydrogencarbonat (6329, Fa. Merck) - entsprechend einer Endkonzentration von 26 mM - in einem Volumen von 4000 ml autoklaviertem Aqua bidest. vollständig gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde unter Verwendung einer 37-prozentigen Salzsäure auf 7,15 äquilibriert und nachfolgend mit 50 ml einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (A 2213, Fa. Biochrom AG) substituiert. Die Konzentration der Antibiotika wurde derart gewählt, dass 100 I.E. Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml des RPMI 1640-Kulturmediums enthalten waren. Das Gesamtvolumen der Lösung wurde auf 5000 ml ergänzt und sofort einer Sterilfiltration (Prefilter: 13400-130-K; Hauptfilter: 11107-142-G, Fa. Sartorius) unterzogen. Das resultierende RPMI 1640-Nährmedium wurde in 90 ml umfassende Einzelportionen abgefüllt und bei einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor jeder Zellisolation erfolgte der Zusatz von 10

ml eines hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserums (FCS, PAA Laboratories, Pasching) - die Endkonzentration des FCS betrug dementsprechend 10 % (V/V).

3.1.3.2 Kulturmedium RPMI 1640, modifiziert mit 5 mM Glucose

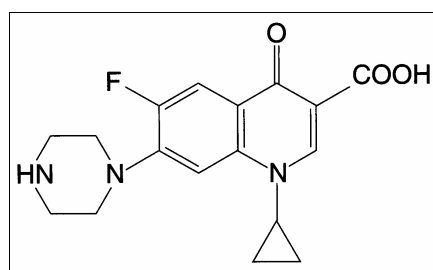
99,1 mg D-Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) wurden zusammen mit 844,0 mg einer D-Glucose-freien RPMI 1640-Trockensubstanz (WIE 074-01800, w L-Glutamine, w/o D-Glucose, Fa. Gibco BRL) sowie 2000,0 mg NaHCO₃ (6329, Fa. Merck) in einem Volumen von 90 ml Aqua bidest. gelöst. Die weitere Modifizierung des Kulturmediums mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin, die Einstellung des pH-Wertes sowie die Sterilfiltration und die Lagerung des RPMI-Kulturmediums erfolgten nach dem gleichen Verfahren wie unter 3.1.3.1 angegeben.

Die unmittelbar vor der Verwendung mit 10 % (V/V) eines hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserums substituierte Nährlösung diente der Kultivierung der isolierten Pankreasinseln bzw. der dissoziierten B-Zellen unter substimulatorischen Bedingungen (5 mM Glucose).

3.1.4 Analysenlösungen der eingesetzten Untersuchungsmethoden

Die Analysenlösungen der untersuchten Fluorchinolone wurden ausgehend von definierten Stammlösungen hergestellt, die bei den entsprechenden Fluorchinolon-Derivaten (Kap. 3.1.4.1 bis 3.1.4.5) im Einzelnen vorgestellt werden. Die Lagerung der in einem wöchentlichen Rhythmus hergestellten Stammlösungen erfolgte in Portionen zu 500 µl bis 1000 µl bei einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C. Die bei den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Moxifloxacin verfügbaren Infusionslösungen wurden unter sterilen Bedingungen in Einzelportionen zu 1000 µl abgefüllt und gemäß den Empfehlungen des Herstellers unter Lichtschutz aufbewahrt.

3.1.4.1 Ciprofloxacin



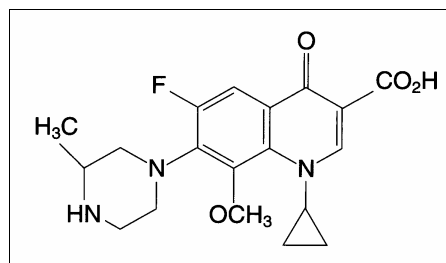
1-Cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolincarbonsäure

Sowohl für die ratiometrischen Messungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, die spektrofluorimetrischen Registrierungen als auch die elektrophysiologischen

Untersuchungen wurden Analysenlösungen eingesetzt, für deren Herstellung eine 6 mM Ciprofloxacin-Infusionslösung (Ciprobay®, Fa. Bayer) als Stammlösung diente. Diese enthielt in einem Volumen von 50 ml 127,2 mg Ciprofloxacinlactat - entsprechend einer Menge von 100,0 mg Ciprofloxacin (MG 331,35). Als weitere pharmakologisch nicht wirksame Komponenten lagen, neben dem Lactat (< 0,3 %), Natriumchlorid sowie Natriumhydroxid (Isotonisierung und pH-Äquilibrierung auf physiologische Werte) in der Infusionslösung vor, deren Herstellung auf *Aqua ad injectabilia* als Lösungsmittel basierte.

Die in den mikrofluorimetrischen und spektroskopischen Messungen eingesetzten Analysen enthielten eine Ciprofloxacin-Konzentration von 100 µM und wurden unmittelbar vor den experimentellen Untersuchungen durch die Verdünnung von 66,6 µl bzw. 499,8 µl der Ciprofloxacin-Infusionslösung auf das erforderliche Endvolumen von 4000 µl bzw. 30 ml hergestellt. Für die *patch clamp*-Messungen wurde eine Ciprofloxacin-Konzentration von 50 µM sowie 100 µM zugrunde gelegt: die extrazelluläre Lösung (s. Kap. 3.1.7.1) wurde vor jedem Versuchszyklus durch den Zusatz des entsprechenden Volumens der Infusionslösung modifiziert.

3.1.4.2 Gatifloxacin



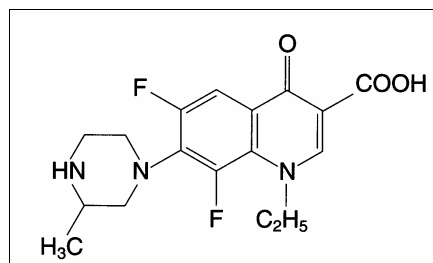
**(*R,S*)-1-Cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-8-methoxy-
(3-methyl-1-piperanzinyl)-4-oxo-3-chinolincarbonsäure**

Das Fluorchinolon stand als Reinsubstanz (Chargennummer 9E0349, Fa. Grünenthal) zur Verfügung und diente bei allen Untersuchungsverfahren als Ausgangssubstanz für die Herstellung einer 5 mM Stammlösung. Dazu wurden 1,872 mg des Fluorchinolons Gatifloxacin (MG 375,4) in 1000 µl Aqua bidest. vollständig gelöst und über einen Zeitraum von einer Woche bei einer Temperatur von 8 °C aufbewahrt.

Die für die ratiometrischen Perifusionsmessungen und spektrofluorimetrischen Untersuchungen erforderlichen Analysenlösungen, die einheitlich eine Konzentration von 100 µM Gatifloxacin aufwiesen, wurden unmittelbar vor jeder Versuchsdurchführung in der folgenden Weise zubereitet: 70 µl der 5 mM Stammlösung wurden auf das erforderliche Endvolumen von 35 ml verdünnt. Die elektrophysiologischen Registrierungen basierten auf Analysen, die eine Konzentration von 50 µM sowie 100 µM Gatifloxacin enthielten. Die

Zubereitung erfolgte unmittelbar vor den elektrophysiologischen Messungen durch die Verdünnung der 5 mM Stammlösung mit dem entsprechenden Volumen der extrazellulären Lösung (s. Kap. 3.1.7.1).

3.1.4.3 Lomefloxacin

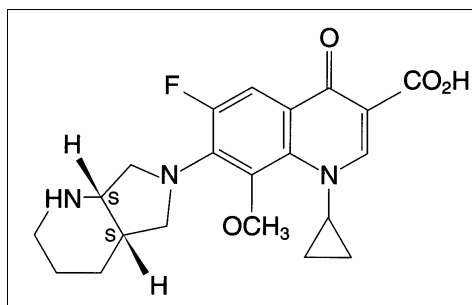


(R,S)-1-Ethyl-6,8-difluor-1,4-dihydro-7-(3-methyl-1-piperanzinyl)-4-oxo-3-chinolincarbonsäure

Eingesetzt wurden 19,39 mg der Reinsubstanz Lomefloxacin (387,8 MG) (L 2906, Fa. Sigma), welche in einem Volumen von 1000 µl Aqua bidest. vollständig gelöst wurde. Es resultierte eine 50 mM Stammlösung, die für die Herstellung der erforderlichen Analysenlösungen eingesetzt wurde.

Die Charakterisierung der endogenen Fluoreszenzeigenschaften als auch die mikrofluorimetrischen Perfusionen erfolgten mit Analysenlösungen, die 100 µM – in einigen Fällen 200 µM - des Fluorchinolons Gatifloxacin enthielten. Die *patch clamp*-Registrierungen wurden demgegenüber mit Lösungen durchgeführt, die jeweils einen Gehalt von 50 µM bzw. 100 µM des Fluorchinolons aufwiesen. Für die Einstellung der jeweiligen Fluorchinolonzkonzentration wurde das entsprechende Volumen der 50 mM Stammlösung mit den einzelnen Medien (s. Kap. 3.1.5, 3.1.6 und 3.1.7.1) der eingesetzten Untersuchungsmethode verdünnt.

3.1.4.4 Moxifloxacin

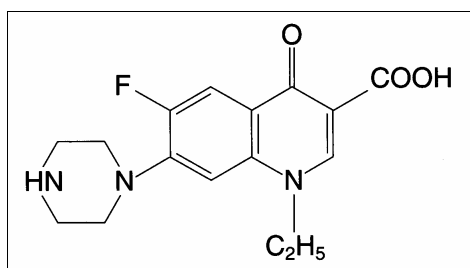


1-Cyclopropyl-6-fluor-1,4-dihydro-8-methoxy-7-[(4aS,7aS)-octahydro-6H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-6-yl]-4-oxo-3-chinolincarbonsäure

Bei diesem Fluorchinolon wurde eine Infusionslösung (Avalox®, Fa. Bayer) als Stammlösung vorgegeben, die in einem Volumen von 50 ml Lösung 87,36 mg Moxifloxacin-Hydrochlorid enthielt – entsprechend einem Gehalt von 80,0 mg bzw. 3,9 mM Moxifloxacin (MG 401,44). Als weitere Hilfsstoffe befanden sich Natriumchlorid - gemäß einer Konzentration von 34 mM Na⁺ - sowie in Spuren Natriumhydroxid und konzentrierte Salzsäure in der Infusionslösung, wobei als Lösungsmittel Wasser für Injektionszwecke eingesetzt wurde.

Sowohl für die spektroskopischen Analysen als auch die ratiometrischen Messungen der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration wurde das Fluorchinolon in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt. Die Herstellung der Testlösungen beruhte auf der Verdünnung von 292,7 µl bzw. 878,2 µl der Stammlösung mit den entsprechenden Medien (s. Kap. 3.1.5 bzw. 3.1.6) auf ein Endvolumen von 10 ml bzw. 30 ml. Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurde die Konzentration des Fluorchinolons auf 50 µM bzw. 100 µM determiniert. Die Zubereitung der Analysenlösungen erfolgte durch die Substitution des extrazellulären Mediums (Kap. 3.1.6.1) mit dem jeweils erforderlichen Volumen der 3,9 mM Infusionslösung.

3.1.4.5 Norfloxacin



1-Ethyl-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-chinolincarbonsäure

Die 50 mM Stammlösung wurde durch das Lösen von 15,97 mg der Reinsubstanz Norfloxacin (MG 319,3) (N 9890, Fa. Sigma) in einem Volumen von 1000 µl DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck) hergestellt.

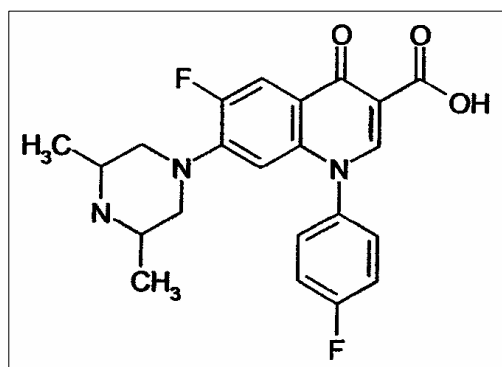
Die Konzentration des Fluorchinolons in den eingesetzten Testlösungen betrug in der Regel 50 µM bzw. 100 µM, für deren Herstellung ein Volumen von 35 µl bzw. 70 µl der 50 mM Stammlösung auf ein Endvolumen von 35 ml mit den definierten Medien (s. Kap. 3.1.5 und 3.1.7.1) verdünnt wurden. Für die spektrofluorimetrische Charakterisierung der endogenen Fluoreszenz wurden 8 µl der Stammlösung auf das erforderliche Endvolumen von 4000 µl mit den modifizierten Krebs-Ringer-Lösungen bzw. den Ca²⁺-defizienten Medien (s. Kap. 3.1.6) verdünnt.

3.1.4.6 Synthetisierte N1-fluorphenylierte Fluorchinolon-Derivate

Die N1-Fluorphenyl-substituierten congenen Fluorchinolon-Derivate C1 bis C4 wurden an dem Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie der Universität Würzburg (Direktorin Frau Professor Dr. U. Holzgrabe) synthetisiert (Jürgens et al., 1996) und für die hier vorgestellten Untersuchungsverfahren zur Verfügung gestellt. Lediglich das Fluorchinolon-Derivat C3 (Sarafloxacin; Mitscher, 2005) wird in der Veterinärmedizin als Chemotherapeutikum verwendet.

Alle im Folgenden aufgeführten 10 mM bzw. 50 mM Stammlösungen der Struktur-Isomere C1 und C2 bzw. C3 und C4 wurden bei einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C unter Lichtschutz aufbewahrt und nach deren Herstellung während eines Zeitraumes von maximal einer Woche verwendet.

a) Dimethyliertes *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1



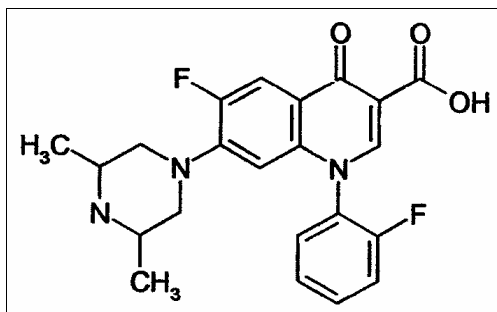
1-(4-Fluorphenyl)-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(2,6-dimethylpiperazin-4-yl)-3-chinolincarbonsäure

Um eine 10 mM Stammlösung zu erhalten, wurden 4,13 mg der Substanz C1 (MG 413,43) in einem Volumen von 1000 µl DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck) unter leichter Erwärmung auf eine Temperatur von 30°C gelöst. Die Herstellung der 100 µM bzw. 200 µM Testlösung des Fluorchinolons basierte auf der Verdünnung von 100 µl bzw. 200 µl der 10 mM Stammlösung mit den unter 3.1.6 definierten Medien auf ein Endvolumen von 10 ml.

Für die ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie und die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden Analysenlösungen verwendet, für deren Herstellung eine 50 mM Stammlösung zu Grunde gelegt wurde. Diese resultierte durch das Lösen von 10,33 mg der kristallinen Substanz (MG 413,43) in einem Volumen von 500 µl DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck), wobei dieser Prozess durch die mäßige Erwärmung auf 37 °C gefördert wurde. Die erforderliche 50 µM bzw. 100 µM Analysenlösung des Fluorchinolons C1 wurde unmittelbar

vor den Versuchen durch die Substitution des unter 3.1.5.1 bzw. 3.1.7.1 definierten Mediums mit dem entsprechenden Volumen der 50 mM Stammlösung zubereitet.

b) Dimethyliertes *o*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2

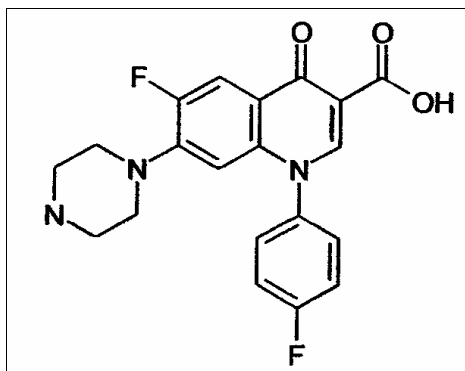


1-(2-Fluorphenyl)-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(2,6-dimethylpiperazin-4-yl)-3-chinolincarbonsäure

Die in den spektrofluorimetrischen Messungen analysierten Testlösungen (100 μ M bzw. 200 μ M) wurden unter Verwendung einer 10 mM Stammlösung hergestellt, die durch das Lösen von 4,13 mg der kristallinen Reinsubstanz des Fluorchinolons C2 (MG 413,43) in einem Volumen von 1000 μ l DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck) unter geringer Wärmeeinwirkung (30 °C) resultierte.

Die Herstellung der Analysenlösungen der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie sowie der elektrophysiologischen Untersuchungen beruhte auf einer 50 mM Stammlösung des Fluorchinolons C2: 10,33 mg der Reinsubstanz (MG 413,43) wurden unter mäßiger Wärmeeinwirkung (30 °C) in einem Volumen von 500 μ l DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck) vollständig gelöst. Unter Verwendung der resultierenden 50 mM Stammlösung wurden die erforderlichen Konzentrationen des Fluorchinolons von 50 μ M und 100 μ M in den Testmedien äquilibriert, wobei die Herstellung in der gleichen Weise wie bei dem Fluorchinolon C1 (s. a)) erfolgte.

c) *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)

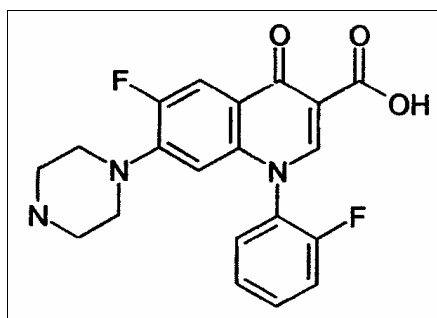


1-(4-Fluorphenyl)-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-4-yl)-3-chinolincarbonsäure

Als Basis für die Zubereitung der 100 μM bzw. 200 μM Analysenlösung des Fluorchinolons C3 diente eine 10 mM Stammlösung, die durch das vollständige Lösen von 3,83 mg der kristallinen Substanz C3 (MG 383,36) in einem Volumen von 1000 μl DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck) unter moderater Erwärmung auf 30 °C hergestellt wurde. Die für die spektrofluorimetrischen Registrierungen erforderlichen Analysenlösungen wurden gemäß dem Versuchsprotokoll mit den modifizierten Krebs-Ringer-Lösungen und den Ca^{2+} -defizienten Medien (s. Kap. 3.1.6) hergestellt.

Für die Durchführung der mikrofluorimetrischen Ca^{2+} -Messungen sowie die elektro-physiologischen Registrierungen wurden die Fluorchinolon-Konzentrationen in den Analysen auf 50 μM bzw. 100 μM determiniert. Die zu Grunde liegende Stammlösung wies einen Gehalt von 50 mM des Fluorchinolons C3 auf und resultierte durch das vollständige Lösen von 19,15 mg der Reinsubstanz in einem Volumen von 1000 DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck). Dieser Prozess wurde durch die mäßige Erwärmung auf eine Temperatur von 30 °C gefördert.

d) *o*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4



1-(2-Fluorphenyl)-6-fluor-1,4-dihydro-4-oxo-7-(piperazin-4-yl)-3-quinolincarbonsäure

Die Zubereitung der 10 mM Stammlösung erfolgte durch das vollständige Lösen von 3,83 mg der kristallinen Reinsubstanz des Fluorchinolons C4 (MG 383,36) in einem Volumen von 1000 μl DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck). Auch bei diesem Fluorchinolon-Derivat war die Zufuhr von Wärmeenergie (30°C) notwendig, um eine vollständige Lösung der Substanz zu gewährleisten. Unter identischen Bedingungen wurde eine 50 mM Stammlösung zubereitet, für deren Herstellung 19,15 mg des Fluorchinolons C4 in einem Volumen von 1000 μl Dimethylsulfoxid *p.a.* (DMSO) (1.02952, Fa. Merck) unter moderater Wärmeeinwirkung (30 °C) vollständig gelöst wurden. Die Zubereitung der 50 μM bzw. 100 μM Analysenlösungen mit den entsprechenden Medien (s. Kap. 3.1.5, 3.1.6 bzw. 3.1.7.1) erfolgte in der gleichen Weise wie bei dem Fluorchinolon C3 (s. c)) erläutert.

3.1.5 Perifusionslösungen der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie

3.1.5.1 HEPES-gepufferte Krebs-Ringer-Bicarbonatlösung

(Krebs-Ringer-Basismedium)

Für die tägliche Herstellung des Perifusionsmediums wurden die notwendigen Stammlösungen 1 bis 6 bei einer Temperatur von $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und während eines Zeitraums von maximal vierzehn Tagen genutzt. Bei den Lösungen handelte es sich im Folgenden um:

1) Stammlösung 1 (0,90 % NaCl)

18,0 g Natriumchlorid *p.a.* (6404, Fa. Merck) wurden in 2000 ml Aqua bidest. gelöst.

2) Stammlösung 2 (1,15 % KCl)

5,75 g Kaliumchlorid *p.a.* (4936, Fa. Merck), gelöst in 500 ml Aqua bidest.

3) Stammlösung 3 (1,62 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

8,10 g Calciumchlorid-Dihydrat *p.a.* (2382, Fa. Merck) wurden in 500 ml Aqua bidest. gelöst.

4) Stammlösung 4 (2,1 % KH_2PO_4)

5,275 g Kaliumdihydrogenphosphat *p.a.* (4873, Fa. Merck), gelöst in 250,0 ml Aqua bidest.

5) Stammlösung 5 (3,82 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

9,55 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat *p.a.* (5886, Fa. Merck) wurden in 250 ml Aqua bidest. vollständig aufgelöst.

6) Stammlösung 6 (1,30 % NaHCO_3)

13,0 g Natriumhydrogencarbonat *p.a.* (6329, Fa. Merck) wurden in einem Volumen von 1000 ml Aqua bidest. gelöst und nachträglich über einen Zeitraum von 30 min mit Kohlenstoffdioxid begast.

7) Stammlösung 7 (7,74 % HEPES, 154 mM NaOH)

Die Herstellung der Stammlösung 7 erfolgte durch die Lösung von 38,7 mg des HEPES (H 3374, Fa. Sigma) in einem Volumen von 125 ml Aqua bidest. als Lösungsmittel. Das resultierende HEPES-Medium wurde nachträglich mit 77 ml einer 1N Natriumhydroxid-Lösung versetzt und auf das erforderliche Endvolumen von 500 ml ergänzt. Für die Stabilität der Stamm-Lösung 7 war es erforderlich, Portionen zu 20 ml bei einer Temperatur unterhalb von $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufzubewahren. Die für jede Perifusionsmessung erforderliche Menge wurde unmittelbar vor der Fertigstellung des Krebs-Ringer-Basismediums in einem Wärmebad aufgetaut.

Das für die ratiometrischen Perfusionen eingesetzte HEPES-haltige Krebs-Ringer-Medium, im Folgenden als Krebs-Ringer-Basismedium bezeichnet, wurde aus den genannten Stammlösungen 1 bis 7 täglich frisch hergestellt. Im Anschluss an die Substitution des organischen HEPES-Puffers (*Stammlösung 7*) erfolgte während eines Zeitraums von 30 min die Begasung mit einer Gasmischung aus 5 % Kohlenstoffdioxid und 95 % Sauerstoff. Auf diese Weise wurde der pH-Wert in dem auf 37 °C temperierten Krebs-Ringer-Basismedium auf einen Wert von 7,4 äquilibriert.

Während der ratiometrischen Perfusionsmessungen wurde das Krebs-Ringer-Medium kontinuierlich mit der genannten Gasmischung begast, so dass die Stabilität des pH-Wert zu jedem Zeitpunkt der Messung vorausgesetzt werden konnte.

Die Endkonzentrationen in dem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer betrugen:

Stammlösung 1:	200,0 ml, die Endkonzentration entsprach	118 mM NaCl
Stammlösung 2:	8,0 ml, die Endkonzentration entsprach	4,7 mM KCl
Stammlösung 3:	6,0 ml, die Endkonzentration entsprach	2,5 mM CaCl ₂
Stammlösung 4:	2,0 ml, die Endkonzentration entsprach	1,2 mM KH ₂ PO ₄
Stammlösung 5:	2,0 ml, die Endkonzentration entsprach	1,2 mM MgSO ₄
Stammlösung 6:	34,0 ml, die Endkonzentration entsprach	20,2 mM NaHCO ₃
Stammlösung 7:	8,0 ml, die Endkonzentration entsprach	4,7 mM NaOH

Das resultierende Endvolumen von 260 ml des Krebs-Ringer-Basismediums enthielt 10 mM HEPES und wurde in Abhängigkeit von dem Versuchsprotokoll für drei bis vier Einzelmessungen benötigt.

3.1.5.2 50 µM D600 ((R,S)-Methoxyverapamil)

Für die Herstellung einer 5 mM Stammlösung wurden 26,05 mg (R,S)-Methoxyverapamil-Hydrochlorid *p.a.* (MG 521) (1014, Fa. Knoll AG) in einem Volumen von 10 ml Aqua bidest. gelöst. Die Perfusion der isolierten B-Zellen erfolgte mit einer 50 µM D600-Lösung, welche durch die Verdünnung von 300 µl der 5 mM Stammlösung mit dem Krebs-Ringer-Basismedium auf ein Endvolumen von 30 ml resultierte.

3.1.5.3 49,5 mM Kaliumchlorid-Lösung

Die Herstellung einer 49,5 mM Kaliumchloridlösung umfasste das Lösen von 29,82 mg des Kaliumchlorids *p.a.* (MG 74,56) (4936, Fa. Merck) in dem Krebs-Ringer-Basismedium, das bereits einen Gehalt von 5,9 mM Kaliumchlorid enthielt, und die Äquilibrierung des Endvolumens auf 10 ml.

3.1.5.4 Mit 3 mM bzw. 10 mM D-Glucose-substituiertes Krebs-Ringer-Basismedium

59,45 mg bzw. 198,2 mg D-Glucose-Monohydrat (MG 198,17) (1.08342, Fa. Merck) wurden in einem Volumen von 100 ml des Krebs-Ringer-Basismediums gelöst, um die Glucose-Konzentration in dem Perifusionsmedium auf 3 mM bzw. 10 mM zu äquilibrieren.

3.1.5.5 Fura-2/AM

a) 1 mM Fura-2/AM-Stammlösung

Für die Herstellung der 1 mM Stammlösung wurden 50,0 µg Fura-2/AM (Acetoxymethylester, MG 1001,86) (F-1121, Fa. Mo Bi Tec, Göttingen bzw. Molecular Probes, Eugene, USA) in einem Volumen von 50 µl DMSO *p.a.* (1.02952, Fa. Merck) gelöst. Die resultierende Lösung wurde unter Lichtschutz bei einer Temperatur von 4 °C gelagert und in einen Zeitraum von maximal drei Wochen für die Messungen eingesetzt.

b) Inkubationslösung für die Beladung der isolierten B-Zellen bzw. Pankreasinseln

2 µl der Fura-2/AM-Stammlösung wurden in einem Eppendorf-Hütchen mit 998 µl des Basismediums (s. 3.1.5.4) vermischt, so dass eine Konzentration von 2 µM Fura-2 resultierte. Diese mit einer Glucose-Konzentration von 5 mM bzw. 10 mM modifizierte Inkubationslösung wurde unmittelbar vor jeder mikrofluorimetrischen Einzelmessung hergestellt und diente während der Beladungsphase der isolierten Langerhans-Inseln bzw. der dissoziierten B-Zellen mit dem ratiometrischen Fluoreszenzindikator als Ersatz für das Kulturmedium.

c) Inkubationslösung für die simulierte Beladung der isolierten B-Zellen

Für die Registrierung der Autofluoreszenz (endogene Fluoreszenz der Fluorchinolone und der Zellisolate) wurden unmittelbar vor jeder simulierten Inkubation 998 µl des Perifusionsmediums (s. 3.1.5.4) zusammen mit 2 µl DMSO *p.a.* (1.02959, Fa. Merck) in einem Eppendorf-Hütchen überführt und wie die unter b) definierte Inkubationslösung verwendet.

3.1.6 Medien der Spektrofluorimetrie

3.1.6.1 Ca^{2+} -freier Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Die Herstellung des Ca^{2+} -freien Mediums erfolgte durch das Einwiegen der folgenden Substanzen und anorganischen Salze, die durch gleichmäßiges Rühren in einem Zeitraum von 10 min vollständig gelöst wurden:

	Endkonzentration
a) 19,02 mg EGTA <i>p. a.</i> (11290, Fa. Serva)	(0,5 mM)
b) 35,78 mg Kaliumchlorid <i>p. a.</i> (4936, Fa. Merck)	(4,8 mM)
c) 16,33 mg Kaliumhydrogenphosphat <i>p. a.</i> (4873, Fa. Merck)	(1,2 mM)
d) 29,58 mg Magnesiumsulfat-Hexahydrat <i>p.a.</i> (1.05833.0250, Fa. Merck)	(1,2 mM)
e) 788,94 mg Natriumchlorid <i>p.a.</i> (6404, Fa. Merck)	(135 mM)
f) 595,78 mg HEPES (H 3374, Fa. Sigma)	(25 mM)

Im Anschluss daran erfolgte mit Hilfe einer Glaselektrode und durch den Zusatz einer 1N NaOH-Lösung die genaue Einstellung des pH-Wertes auf 7,4. Die resultierende Lösung wurde in einen Messkolben überführt und das Endvolumen mit Aqua bidest. zu 100 ml ergänzt. Die Sterilfiltration und Lagerung des Mediums erfolgte in der gleichen Weise, wie bei dem KRHP (s. Kap. 3.1.1) erläutert wurde.

3.1.6.2 Ca^{2+} -freier Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, substituiert mit 3 mM D-Glucose und 1-prozentigem Albumin

Die Herstellung der Lösung erfolgte nach der unter 3.1.6.1 angeführten Herstellungsvorschrift. Vor der vollständigen Ergänzung des Endvolumens auf 100 ml, wurde die Lösung durch den Zusatz von 59,45 mg D-Glucose-Monohydrat (1.08342, Fa. Merck) sowie 1,0 g Albumin (11930, Fa. Serva) modifiziert. Die sterilfiltrierte Lösung wurde in Portionen zu 10,0 ml bei einer Temperatur von 8 °C gelagert.

3.1.6.3 Mit 3 mM bzw. 10 mM D-Glucose modifizierter Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Für die Herstellung, die Sterilfiltration und die Lagerung der Lösung wurde die Vorschrift 3.1.1 (KRHP) zu Grunde gelegt. Zusätzlich wurden in 100,0 ml des KRHP 59,45 mg bzw. 198,2 mg D-Glucose-Monohydrat (MG 198,17) (1.08342, Fa. Merck) gelöst, um eine D-Glucose-Konzentration von 3 mM bzw. 10 mM zu erhalten.

3.1.7 Medien der patch clamp-Analysen

3.1.7.1 Extrazelluläre Lösung (EZ)

Für die Herstellung von 2000 ml des extrazellulären Mediums wurden folgende Salze in der genannten Reihenfolge in Aqua bidest. als Lösungsmittel gelöst:

	Endkonzentration
a) 835,0 mg Kaliumchlorid <i>p.a.</i> (4936, Fa. Merck)	(5,6 mM)
b) 488,0 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat <i>p.a.</i> (4873, Fa. Merck)	(1,2 mM)

- c) 764,60 mg Calciumchlorid-Dihydrat *p.a.* (2382, Fa. Merck) (2,6 mM)
 d) 16,36 g Natriumchlorid *p.a.* (6404, Fa. Roth) (140 mM)

Die resultierende Lösung wurde mit 4,766 g des HEPES (H 3374, Fa. Sigma) substituiert und der pH-Wert mit einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung auf 7,4 äquilibriert. Die *patch clamp*-Messungen in der *whole cell*-Konfiguration wurden in Abwesenheit von Glucose in dem externen Medium durchgeführt.

3.1.7.2 Pipettenlösung bzw. intrazelluläre Lösung (IZ)

Die Zubereitung der Pipettenlösung erfolgte durch das Lösen der genannten Salze und des Ca^{2+} -Komplexbildners EGTA in Aqua bidest. als Lösungsmittel:

	Endkonzentration
a) 522,0 mg Kaliumchlorid <i>p.a.</i> (4936, Fa. Merck)	(140 mM)
b) 10,17 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat <i>p.a.</i> (4873, Fa. Merck)	(1 mM)
c) 14,70 mg Calciumchlorid-Dihydrat <i>p.a.</i> (2382, Fa. Merck)	(2 mM)
d) 190,2 mg EGTA <i>p.a.</i> (11290, Fa. Sigma)	(10 mM)

Das Endvolumen wurde auf 50 ml eingestellt und der pH-Wert mit einer 1 N Kaliumhydroxid-Lösung auf einen physiologischen Wert von 7,4 äquilibriert.

3.1.7.3 50 mM bzw. 500 µl Tolbutamid-Lösung

Die Herstellung der 50 mM Tolbutamid-Stammlösung beruhte auf der vollständigen Lösung von 6,76 mg Tolbutamid (MG 270,30) (Fa. Serva, Feinbiochemical Heidelberg) in einem Volumen von 500 µl einer 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung. Die in den *patch clamp*-Registrierungen eingesetzte 500 µM Tolbutamid-Lösung wurde durch die Modifizierung des extrazellulären Mediums (s. Kap. 3.1.7.1) mit dem entsprechenden Volumen der 50 mM Tolbutamid-Stammlösung zubereitet.

3.1.7.4 300 mM bzw. 300 µM Diazoxid-Lösung

Die Zubereitung der 300 mM Diazoxid-Stammlösung erfolgte durch das vollständige Lösen von 69,21 mg der Reinsubstanz Diazoxid (MG 230,70) (Fa. Sigma, Deutschland) in einem Volumen von 1000 µl DMSO. Die Herstellung der 300 µM Testlösung basierte auf der Verdünnung der 300 mM Stammlösung mit dem extrazellulären Medium in einem Verhältnis von 1:1000.

3.2 Spendertiere

3.2.1 NMRI-Albinomäuse

Als Spendertiere für die nativen Pankreasinseln bzw. die endokrinen B-Zellen dienten weibliche NMRI-Auszuchtmäuse (Hsd. Win: NMRI, Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln bzw. Crl: NMRI, Fa. Charles River), die ein durchschnittliches Gewicht von 25 g aufwiesen. Die Albinomäuse wurden in einem Alter von zwölf bis vierzehn Wochen für die Gewebe- bzw. Zellisolation herangezogen und erhielten während dieser Phase täglich ein kommerzielles Standardfutter *ad libitum* (Altromin 1324, Fa. Altromin).

Die NMRI-Albinomäusen wurden 1937 ursprünglich als Schweizer Auszuchtmäuse von Lynch an dem *National Institute of Health* eingeführt und nachfolgend an dem *Naval Medical Research Institute* als NMRI-Auszuchtmäuse etabliert. Dieses Mausmodell ist durch eine ausgeprägte Heterogenität des Genoms gekennzeichnet und in Deutschland, neben anderen kommerziellen Anbietern, bei dem Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover erhältlich (Fa. M&B Animal Models, Data Sheet).

3.2.2 SUR1-knock out-Mäuse

Für die Untersuchung der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effekte der Fluorchinolone wurde das in einer Arbeitsgruppe um Aguilar-Bryan und Bryan entwickelte und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellte homozygote SUR1-knock out-Mausmodell gewählt (Seghers et al., 2000). Die gezielte Inaktivierung des SUR1-codierenden Gens *ABCC8* wird durch den Austausch des Exons 2 durch eine Puromycinresistenz-Kassette erreicht. Aufgrund der fehlenden Expression der regulatorischen SUR1-Untereinheit, die für die Translokation und die Insertion der $K_{IR6.2}$ -Untereinheit in die Plasmamembran eine entscheidende Funktion erfüllt (Zerangue et al., 1999; Tucker et al., 1997), ist die Rekonstitution des heterotetrameren K_{ATP} -Kanals in der Plasmamembran nicht möglich.

Die elektrophysiologischen und funktionellen Eigenschaften der Zellen sowie die Physiologie der transgenen SUR1-knock out-Mäuse sind in einigen Publikationen hinreichend charakterisiert worden (Nenquin et al., 2004; Seghers et al., 2000). Bezüglich der Glukose-Homöostase und Insulinsekretion weisen die Tiere phänotypisch keine Auffälligkeiten auf, die auf Hypoglykämien bzw. Hyperinsulinämien hindeuten würden.

Die Tiere wurden - analog den NMRI-Albinomäusen - unter Einhaltung eines 12stündigen Tag-und-Nacht-Rhythmus bei einer Temperatur von 24 °C gehalten und erhielten das Standardtrockenfutter (Altromin 1324, Fa. Altromin) sowie Trinkwasser *ad libitum*.

3.3 Gewebeisolierung und nachfolgende Zellkultivierung

Die Isolation der für die mikrofluorimetrischen und elektrophysiologischen Untersuchungen erforderlichen endokrinen B-Zellen erfolgte nach zwei unterschiedlichen Verfahren, die sich von dem etablierten Collagenase-Digestionsverfahren ableiten. Die in den Kapiteln 3.3.1 und 3.3.2 erläuterten Methodiken differenzieren sich hinsichtlich der Collagenase-katalysierten Proteolyse des exokrinen Pankreas grundlegend voneinander: nach dem konventionellen Verfahren (s. Kap. 3.3.1) wird zunächst das Pankreas vollständig exzidiert, bevor die Exposition mit dem Enzym stattfindet. Bei dem zweiten Verfahren (s. Kap. 3.3.2) wird dagegen die in dem KRHP gelöste Collagenase vor der Exzision direkt in den Gallengang injiziert und daraufhin das diffuse Pankreas exzidiert.

Die Isolation intakter Pankreasinseln, unter deren Verwendung die Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration während einer Fluorchinolon-Exposition analysiert wurde (s. Kap. 4.2.3.2), erfolgte ausschließlich nach dem konventionellen Verfahren der Collagenase-Digestion (s. Kap. 3.3.1).

3.3.1 Isolation der endokrinen B-Zellen nach dem konventionellen Collagenase-Digestions-Verfahren

Die Spendertiere wurden durch Decaptation getötet und das Pankreas sofort unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Isolation der Langerhansinseln aus dem Gewebeverband erfolgte nach dem konventionellen Verfahren der Collagenase-Digestion (Moskalewski, 1965; Lacy und Kostianovsky, 1967; Lernmark, 1974). Bei dieser Methode wird das Enzym Collagenase (Collagenase P, Fa. Roche Diagnostic, s. Kap. 3.1.2.2) eingesetzt, um die Freisetzung der einzelnen Inseln aus dem exokrinen Gewebe des mit Hilfe einer Schere (5 min) fein zerteilten Pankreas zu ermöglichen. Besonders kritisch ist bei diesem Verfahren das Herauslösen der Langerhans-Inseln aus den Gewebesegmenten zu bewerten, da die Inseln durch die Enzymaktivität in ihren funktionellen Eigenschaften nicht beeinträchtigt werden dürfen. Aus diesem Grund mussten alle Schritte dieses zeitpräzise durchgeführt werden.

Um die Proteolyse des exokrinen Gewebes einzuleiten, wurde das in 2 ml des KRHP (5 mM D-Glucose) suspendierte und mit 1,0 mg Collagenase versetzte Zellmaterial in einem auf 37 °C temperierten Schüttelbad (ST1-338, Fa. Bühler) mit einer Frequenz von 328 U/min gleichmäßig geschüttelt (8 min). Die Pankreasinseln wurden anschließend durch intensives, manuelles Schütteln (10 sec) aus dem aufgeschlossenen, sehr diffusen Gewebe extrahiert.

Nachfolgend wurde die enzymatische Reaktion durch die Verdünnung mit ungefähr 20 ml des eiskühlten KRHP (5 mM Glucose) beendet.

Die mit dem Krebs-Ringer-Puffer gereinigten und suspendierten Gewebefragmente wurden in eine Petrischale überführt, welche zur Kontrasterhöhung eine schwarze Färbung aufwies. Auf diese Weise war es möglich, die Langerhans-Inseln unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette aus den diffusen Gewebefragmenten zu isolieren. Diesbezüglich wurden Inseln mit einem geringen Durchmesser bevorzugt, da sich diese durch eine stabilere Adhäsionsfähigkeit in der initialen Phase der Zellkultivierung sowie eine intensivere Ansprechbarkeit gegenüber einem moderaten Glucose-Stimuli (10 mM) auszeichneten.

Die isolierten Inseln wurden zunächst mit dem KRHP und nachfolgend mit dem RPMI 1640-Kulturmedium (10 mM Glucose, 10 % (V/V) fötales Kälberserum) gereinigt, wobei die Lösungen und die darin enthaltenden Verunreinigungen durch Zentrifugation von dem Zellmaterial abgetrennt wurden. Die Dissoziation der Pankreasinseln in die einzelnen B-Zellen erfolgte durch die Inkubation in einem Ca^{2+} -freien KRHP und die anschließende einminütige Vortexung (Vortex-Genie 2, Fa. Scientific Industries). Die resultierenden Einzelzellen wurden zunächst durch Zentrifugation von dem Ca^{2+} -defizienten Medium isoliert und in dem KRHP resuspendiert. Nach der wiederholten Reinigung mit dem RPMI 1640-Kulturmedium, in dem sich 10 mM Glucose und 10 % (V/V) fötales Kälberserum befanden, erfolgte die Aussaat der suspendierten Zellen auf Deckgläschen bzw. direkt auf dem Boden der sterilen Zellkulturschale (NuncTM Surface, Fa. Nunc) (s. Kap. 3.3.2.2).

3.3.2 Isolation der endokrinen B-Zellen nach dem Verfahren der direkten Collagenase-Injektion

Diese Methodik, die eine Weiterentwicklung des konventionellen Verfahrens nach Gotoh et al. (1985) und Zimny et al. (1993) darstellt, wurde gewählt, um eine höhere Anzahl an Pankreasinseln bzw. endokriner B-Zellen aus dem exokrinen Gewebe isolieren zu können. Mit dieser Methode gelang es, durchschnittlich 200 bis 250 Langerhans-Inseln aus dem exokrinen Pankreasgewebe zu gewinnen; durch die konventionelle Digestion des Pankreas konnten demgegenüber lediglich 100 bis 120 Inseln präpariert werden.

Die direkte Injektion der Collagenase in das Pankreasgewebe ermöglichte bereits nach einer kurzen Inkubationsphase von 10 min bis 15 min die Isolation der nahezu vollständig aus dem exokrinen Pankreas freigesetzten Langerhans-Inseln, so dass die mechanische Beanspruchung im Vergleich zu der konventionellen Methode reduziert werden

konnte. Zudem ließ sich feststellen, dass sich die isolierten Zellcluster bzw. Einzelzellen durch eine höhere Adhäsionsrate auf den Deckgläschen auszeichneten. Nachteilig erwies sich jedoch die teilweise ausgeprägte Reaktivität der endokrinen B-Zellen, die sich bei einigen ratiometrischen Perifusionsmessungen durch intensive Fluktuationen des $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofils unter basalen Bedingungen äußerte.

Für die praktische Durchführung der Zellisolation wurde vor der Exzision des Pankreas die zuvor in 3 ml des eisgekühlten KRHP (5 mM Glucose) gelöste Collagenase P (0,5 mg bis 1,0 mg pro ml) in den dargestellten Gallengang injiziert. Dazu wurde die Collagenaselösung in einer sterilen 2,0 ml Einwegspritze aus Kunststoff (Injekt® Braun) luftblasenfrei aufgezogen und in einem Eisbett gekühlt. Als Kanüle diente die sterile BD Microlance™ 3 (0,3x13,0; Luer-Lock, 30 Ga 1/2) der Firma Becton Dickinson und Company. Die weibliche NMRI- bzw. SUR1-*knock out*-Maus wurde wie in dem unter 3.3.1 beschriebenen konventionellen Verfahren durch zervikale Dislokation getötet und auf einer stabilen Unterlage fixiert. Die mit Ethanol sterilisierte Bauchdecke wurde eröffnet und der zwischen der Gallenblase sowie dem *Duodenum* lokalisierte *Ductus choledochus* dargestellt. Die Isolation von dem umgebenden Bindegewebe erfolgte mit Hilfe einer sterilen Pinzette. Die charakteristisch weiß leuchtende Kanalmündung des *Ductus* in dem Darm wurde mit einer Venenklemme retrograd verschlossen. Die Injektion der eisgekühlten Collagenaselösung in den leicht gespannten *Ductus choledochus* erfolgte unter einem Binokular-Mikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss). Die erfolgreiche Injektion des Collagenase-substituierten KRHP (5 mM Glucose) und die retrograde Passage des *Ductus pancreaticus* wurden durch das Aufwölben des Pankreasgewebe indiziert, wodurch das Gewebe deutlich glasig erschien.

Das bereits sehr diffuse Pankreas wurde in einem konisch zulaufenden und verschließbaren 10,0 ml Kunststoffröhrchen (Fa. Sarstedt) aufgenommen und in Abhängigkeit von der Enzymaktivität über einen Zeitraum von 10 bis maximal 15 Minuten in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die wiederholte Reinigung mit 5 ml des eisgekühlten KRHP. Der nach Zentrifugation (15 sec, 300 x g) resultierende Überstand, der weitgehend das exokrine Pankreasgewebe, Fettgewebe und andere Verunreinigungen enthielt, wurde verworfen und das endokrine Gewebe mit dem gekühlten KRHP aufgenommen. Die nachfolgende Reinigung der resuspendierten Pankreasinsel und die Isolation der dissoziierten B-Zellen erfolgte in identischer Weise, wie bei dem konventionellen Verfahren vorgegeben wurde (s. Kap. 3.3.1).

3.3.3 Kultivierung der Pankreasinseln

Die Adhäsion der Pankreasinseln auf den gereinigten und hitzesterilisierten Deckgläschen (Menzel-Gläser der Stärke 1, Ø 0,25 mm), die in den ratiometrischen Fluoreszenzmessungen als Objektträger dienten, wurde durch die Präparation der Glasoberfläche mit einer Collagenlösung erheblich gefördert (Lenzen und Peckmann, 2001). Die Beschichtung der zuvor markierten zentralen Bereiche der Deckgläschen erfolgte unter sterilen Bedingungen (*clean bench*), wobei 1 µl der in 0,2-prozentiger Essigsäure gelösten Collagenase (Typ 1) mit einer Eppendorfpipette flächig ausgestrichen wurde. Im Anschluss an die zehnmünütige Trocknungsphase wurden die mit dem RPMI 1640-Kulturmedium (10 mM Glucose, 10 % (V/V) fötales Kälberserum) gereinigten und resuspendierten Pankreasinseln auf die präparierten Deckgläschen transferiert: jeweils eine Insel wurde mit 100 µl des Kulturmediums zentral auf die Collagenasebeschichtung pipettiert.

Die initiale Adhäsionsphase erfolgte über einen Zeitraum von 1,5 h bis 2,0 h unter physiologischen Bedingungen (37 °C, 5 % (V/V) CO₂) in einem Brutschrank. Die nachfolgende Kultivierungsphase wurde durch den Zusatz von 2,5 ml des mit 5 mM Glucose und 10 % (V/V) eines fötalen Kälberserums modifizierten RPMI 1640-Mediums eingeleitet. Die Pankreasinseln konnten nach einem Zeitraum von 18 Stunden für die ratiometrischen Fluoreszenzmessungen eingesetzt werden und wurden in den nachfolgenden drei Tagen für die fluorimetrischen Ca²⁺-Messungen verwendet. Ein Wechsel des Kultivierungsmediums war unter diesen Bedingungen nicht erforderlich.

3.3.4 Kultivierung der isolierten B-Zellen

Die gereinigten B-Zellen wurden in 120 µl RPMI 1640-Nährmedium transferiert, das zusätzlich fetales Kälberserum (10 % (V/V)) und 10 mM D-Glucose enthielt. Jeweils 20,0 µl bis 30,0 µl der Zellsuspension - entsprechend einer Anzahl von 40 bis 60 Zellen pro Plättchen - wurden auf einem Glasplättchen (Menzel-Gläser der Stärke 1, Ø 0,25 mm) oder direkt auf die Kunststoffoberfläche der Zellkulturschale (NuncTM Surface, Fa. Nunc) pipettiert. Im Anschluss daran wurde bei einer Temperatur von 37 °C in einer mit 5 % CO₂ angereicherten Atmosphäre die Adhäsionsphase in einem Brutschrank (CO₂ Incubator, Fa. Sanyo Biomedicals, Japan) eingeleitet. In dieser ersten Phase, die einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden umfasste, erfolgte das Anwachsen der Zellen auf dem Trägermaterial bzw. den Glasdeckgläschen.

Durch den Zusatz von 2,5 ml des 5 mM D-Glucose-haltigen und zusätzlich mit 10 % (V/V) fötalem Kälberserum versetzten RPMI 1640-Nährmediums pro Glasplättchen bzw.

Petrischale wurde die zweite Phase der Kultivierung eingeleitet. Die Verwendung der endokrinen B-Zellen für die ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen bzw. die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgte frühestens nach einem Zeitraum von 18 Stunden, wobei die Einzelzellen maximal bis zu dem vierten Tag nach der Isolation verwendet wurden.

Die nach dem zweiten Verfahren isolierten B-Zellen wiesen eine wesentlich höhere Dichte in der Suspension auf, so dass auf dem Deckgläschen bzw. dem Boden der Zellkulturschale eine um den Faktor 2 bis 3 höhere Anzahl an Zellen transferiert wurde. Der damit einhergehende gesteigerte Nährstoffbedarf erforderte einen täglichen Medienwechsel, wobei die Glucose-Konzentration in der RPMI 1640-Lösung von 5 mM auf 10 mM Glucose gesteigert wurde. Dieser mäßig stimulierend wirkende Glucose-Gehalt (Ashcroft und Rorsman, 1989) gewährleistete eine ausreichend hohe Ansprechbarkeit der kultivierten B-Zellen gegenüber einem externen K^+ -Stimulus (49,5 mM KCl) während der Kontrollphase. Unter basalen Kultivierungsbedingungen (5 mM Glucose) waren die Glucose-Sensitivität und die Reaktion der Zellen gegenüber diesem Kontrollstimulus deutlich geringer ausgeprägt.

3.4 Spektrofluorimetrie

Die Charakterisierung der qualitativen und quantitativen Autofluoreszenz der Fluorchinolone wurde mit dem Spektralfluorimeter F-4500 (Fa. Hitachi, Japan) durchgeführt. Mit diesem Spektrometer ist die Messung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Exzitation und der Emission über ein weites Wellenlängen-Intervall von 200 nm bis 730 nm durchführbar, so dass die resultierenden Fluoreszenzspektren als zweidimensionale („2D-Scan“) bzw. dreidimensionale („3D-Scan“) Contour-Plots (s. Abb. 3.4.2) dargestellt werden können. Die für die monochromatische Zerlegung der elektromagnetischen Strahlung erforderlichen Exzitations- und Emissions-Monochromatoren sind unabhängig voneinander innerhalb des Spektrofluorimeters integriert (s. Abb. 3.4), wobei die spektralen Bandbreiten durch mechanische Spalteinstellungsmechanismen variierbar sind. Um die Erscheinung von Rayleigh-Streuungen zu vermeiden, wurden für die Analyse der endogenen Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Fluorchinolone das Wellenlängen-Intervall der Exzitation sowie der Spektralbereich der Emission bei unterschiedlichen Wellenlängen festgelegt.

Die mit dem photometrischen System durchgeführten spektrofluorimetrischen Messungen basierten auf dem Prinzip der „*monochromatic light monitoring ratio calculation*“, so dass vor der Digitalisierung der analogen Signale jeweils die Ratio aus der photomultiplizierten endogenen Fluoreszenzintensität der Testsubstanz und der Intensität des ausgekoppelten Referenzsignals gebildet wurde. Auf diese Weise war es möglich,

Schwankungen der Lichtquellen-abhängigen spektralen Intensität zu kompensieren. Zudem wurden Signale, die von den optischen Komponenten des Meßsystems bzw. dem Medium ausgingen, durch Referenzmessungen und den Nullpunktgleich berücksichtigt.

Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte durch die von einer Xenon-Gasentladungslampe (Fa. Hamatsu, Japan) emittierten Strahlung. Die Selektion der jeweiligen Exzitationswellenlänge aus dem kontinuierlichen Spektrum wurde durch den Einsatz eines Gittermonochromators als disperses Element realisiert: die Exzitationsstrahlung wurde in 5 nm-Inkrementen auf die Messküvette mit der entsprechenden Analysenlösung ($V = 2,5$ ml) eingestrahlt. Verwendet wurden Quarzglasküvetten (Fa. Zeiss) sowie aus optischem Spezialglas hergestellte Präzisionsküvetten (Fa. Hellmann) mit einer Schichttiefe von 10,0 mm, welche exakte Fluoreszenzmessungen in einem Wellenlängen-Intervall von 320 nm bis 2500 nm gewährleisten.

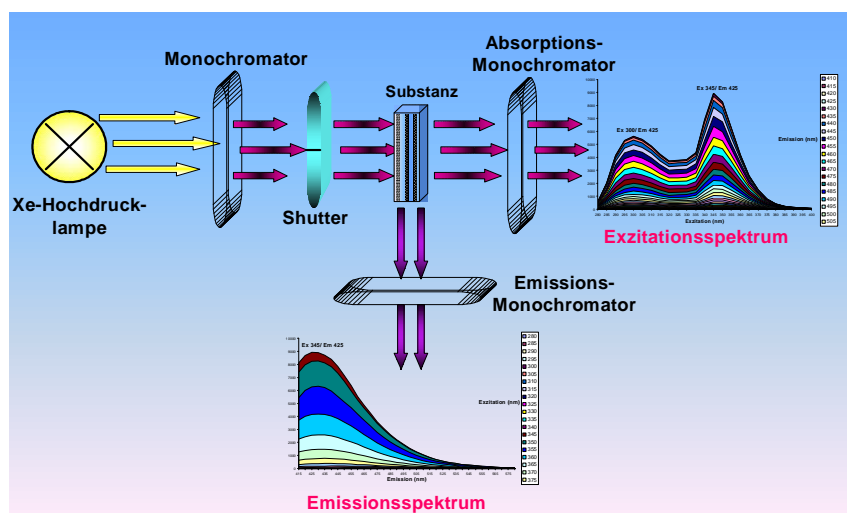


Abbildung 3.4 Schematischer Aufbau eines Spektrofluorimeters (allgemeines Prinzip) Bei der Messanordnung des verwendeten Versuchsprotokolls diente eine Xenon-Gasentladungslampe als Anregungsquelle, aus deren Emissionsspektrum mit Hilfe eines optischen Gitters die gewünschte monochromatische Strahlung selektiert und auf die Analysenlösung eingestrahlt wurde. Nicht dargestellt ist der unmittelbar vor der Küvette positionierte Strahlenteiler („beam splitter“), der die Auskopplung der Exzitationsstrahlung und Umlenkung auf einen Referenzdetektor ermöglichte. Dieser Prozess diente dem Ausgleich von Intensitätsschwankungen der Anregungsquelle, so dass die Ratio aus dem Fluoreszenzsignal der angeregten Fluorchinolone und dem ausgekoppelten Referenzsignal gebildet werden konnte. Der vor der Küvette positionierte Shutter verhinderte zeitgesteuert den Einfall weiterer Exzitationsstrahlung auf die Probe. Bei dem Emissions- als auch dem Exzitations-Monochromator handelte es sich um ein Gitter mit justierbarer spektraler Bandbreite. (Nähere Erläuterungen werden in dem Text gegeben).

Die Registrierung der emittierten Fluoreszenzstrahlung erfolgte in einem 90°-Winkel zu dem Strahlengang der Exzitationsstrahlung („right-angle-detector“), so dass Störsignale, hervorgerufen durch die wesentlich energiereiche Exzitationsstrahlung sowie Reflexionen,

Lichtstreuungen oder Autofluoreszenzsignale der optischen Komponenten, bei dieser gewählten Geometrie auf ein Minimum reduziert werden konnten. Während der Messung der induzierten Fluoreszenzemission beendete der zeitgesteuerte Verschluss eines vor der Probe justierten *Shutters* die Anregung der Fluorochinolone. Die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung wurde in Analogie zu der Fluoreszenzmikroskopie (s. Kap. 3.5) durch einen Photomultiplier registriert und multipliziert.

Die aus dem korrespondierenden Mess- und Referenz-Signal gebildete Ratio wurde digitalisiert und an die computergesteuerte Sektion geleitet. Diese ermöglichte die visuelle Charakterisierung der qualitativen und quantitativen Fluoreszenzeigenschaften als zwei- bzw. dreidimensionaler *Contour-Plot*, in dem die Intensitätsverteilung der Fluoreszenzstrahlung topologisch als farbcodierte Bereiche darstellt wurde. Außerdem war es möglich, zu jedem dreidimensionalen Fluoreszenzspektrum das entsprechende Exzitations- und Emissionspektrum abzubilden. Die Auswertung und visuelle Darstellung der Spektren sowie die Justierung der Parameter erfolgten zunächst auf DOS-Ebene. Die gespeicherten Werte wurden in Excel-Dateien umgewandelt, so dass diese für die weitere Bearbeitung und Auswertung auf Windows-Ebene zur Verfügung standen.

3.4.1 Parameter der spektrofluorimetrischen Registrierungen

Parameter der Fluoreszenzmessungen	
Wellenlängen-Intervall der Exzitation:	200-480 [nm]
Wellenlängen-Intervall der Emission:	400-580 [nm]
Exzitationsquelle:	Xe-Hochdruckgasentladungslampe
Scan Speed:	◇240 [nm/min]
Scan Speed:	1200 [nm/min]
Sampling Intervall bzw. Schrittweite der Exzitations-/Emissions-Wellenlänge:	5,0/5,0 [nm]
Spektrale Bandbreite (Ex/Em):	5,0/5,0 [nm]
Empfindlichkeit (PMT Voltage) bzw. Photomultiplierspannung:	700/*400 [V]

Tabelle 3.4.1 Parameter der spektrofluorimetrischen Analyse der endogenen Fluoreszenzeigenschaften ausgewählter Fluorochinolone

Die endogenen Fluoreszenzeigenschaften der analysierten Fluorochinolone wurden unter identischen Versuchsbedingungen bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 7,4

registriert. In der Regel galten die in Tabelle 3.4.1 angeführten Parameter, wobei das kontinuierlich mit einer Schrittweite von 5 nm untersuchte Wellenlängen-Intervall des Exzitations- bzw. Emissionsspektrums in Abhängigkeit von den qualitativen Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Fluorchinolone determiniert wurde. Die initialen Untersuchungen wurden zunächst mit einer „scan speed“-Geschwindigkeit von 240 nm/min (◇) und einer mittleren Photomultiplier-Spannung von 400 V (*) durchgeführt, um im weiteren Verlauf auf eine Geschwindigkeit von 1200 nm/min und eine höhere Empfindlichkeit (700 V) gesteigert zu werden.

3.4.2 Registrierung der Exzitations- bzw. Emissionsspektren optisch aktiver Substanzen und Determinanten der Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzanregung ist neben der Absorption von Photonen bzw. Lichtquanten durch Elektronenstöße infolge einer Gasentladung realisierbar. Ein derartiger Prozess wird zum Beispiel durch den Einsatz eines Xenon-Strahlers oder einer Quecksilberbogenlampe (Linienstrahler), deren Spektrum bei diskreten Wellenlängen ausgeprägte Intensitätsspitzen aufweist, hervorgerufen. Die Exzitation der optisch aktiven Komponente (Chromophor bzw. Fluorophor) stimuliert - neben dem Transfer von Elektronen aus dem Grundzustand auf einen diskreten Anregungszustand eines energetisch höheren Niveaus - Schwingungs- und Rotationszustände innerhalb des Moleküls. Als Konsequenz resultiert ein komplexes Muster aus Schwingungsstrukturen, das sich aus den scharfen Absorptions- bzw. Emissionslinien der Elektronenübergänge und den Linien der evozierten Molekülschwingungen und Rotationszustände zusammensetzt. Bedingt durch die geringe Auflösung des Spektrofluorimeters und die Überlagerung der Spektrallinien resultiert ein breites, weitgehend strukturloses Absorptions- bzw. Emissionsspektrum, das in Abhängigkeit von dem pH-Wert und der Temperatur durch variable Bandbreiten gekennzeichnet ist (s. Abb. 3.4.2.1 und 3.4.2.2).

Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung unterliegt zahlreichen exogenen Einflüssen, die unter anderem durch die Konsistenz des Mediums, die Temperatur und den pH-Wert sowie das Ausmaß der Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und der Exzitationsstrahlung determiniert werden. Dementsprechend beeinflussen Interaktionen zwischen den fluoreszenzaktiven Fluorchinolonen und den Molekülen bzw. Ionen des Mediums die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung. Die Übertragung partieller Beträge der Anregungsenergie von dem Chromophor bzw. Fluorchinolon auf Komponenten des Mediums („Quencher“) äußert sich durch die Verringerung der Fluoreszenzintensität und implizit der Quantenausbeute. Dieser komplexe Prozess ist allgemein unter dem Terminus

Fluoreszenzlöschung bzw. „*Quenching*“ bekannt. Definitionsgemäß sind statisch bedingte Reduktionen der Fluoreszenzintensität auf Chelat- bzw. Komplexbildungen zwischen dem Fluorophor und den Ionen des Mediums zurückzuführen. Statische *Quenching*-Prozesse finden bevorzugt in leicht polarisierbaren Lösungsmitteln mit ausgeprägten Solvatisierungseigenschaften statt - Kriterien, die insbesondere von wässrigen Medien erfüllt werden. Dynamische Fluoreszenzlöschungen sind dagegen auf diffusionskontrollierte Wechselwirkungen zwischen dem angeregten Fluorophor und den Komponenten des exogenen Milieus zurückzuführen.

Die Aufnahme des Exzitationsspektrums eines Chromophors erfolgt indirekt über die Fluoreszenzmessung, da nach dem von Lambert und Beer postulierten Gesetz die Intensität der Fluoreszenzstrahlung I_{Fl} der Lichtintensität der absorbierten Strahlung I_0 näherungsweise proportional ist:

$$I_{\text{Fl}} = I_0 \times 10^{-\epsilon[X]l} \quad (\epsilon: \text{molarer Absorptionskoeffizient})$$

Die Intensität der Strahlungsabsorption ist dabei abhängig von dem Absorptionskoeffizient ϵ sowie der Konzentration $[X]$ des absorbierenden Chromophors in dem Medium. Die Frequenz ν_{Ex} der Exzitationsstrahlung und die Weglänge l der Strahlung durch die Probe determinieren ebenfalls das Ausmaß der Strahlungsabsorption und damit einhergehend die Fluoreszenzintensität.

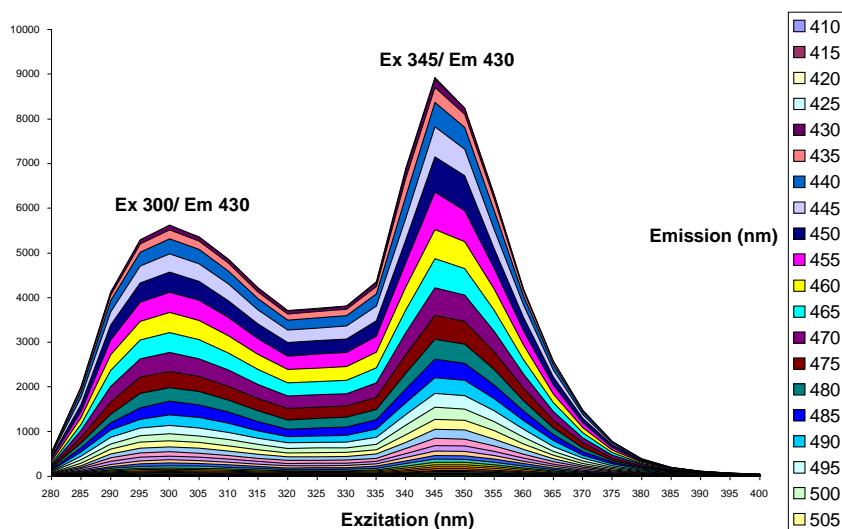


Abbildung 3.4.2.1 Exzitationsspektrum des o-Fluorphenyl-Fluorochinolons C2 Die Absorption der Exzitationsstrahlung wurde in Abhängigkeit von der Wellenlänge der korrespondierenden Emissionsstrahlung bei äquidistanten Wellenlängen in einem Spektralbereich von 280 nm bis 400 nm registriert. Bereiche unter der Kurve, die eine einheitliche Färbung aufweisen, repräsentieren definierte Werte der relativen Fluoreszenzintensität. Das dargestellte, bei Raumtemperatur registrierte Spektrum bezieht sich auf eine Fluorochinolon-Konzentration von 100 μM , die in dem Krebs-Ringer-Basismedium vorlag.

Für die umfassende Charakterisierung der Exzitationseigenschaften der einzelnen Fluorchinolone wurden das Ausmaß der Exzitation bzw. Absorption der Anregungsstrahlung nicht ausschließlich bei der Wellenlänge des Emissionsmaximums registriert, sondern kontinuierlich in 5 nm-Inkrementen über das gesamte, der jeweiligen Substanz angepasste Wellenlängen-Intervall - charakteristischerweise in einem Spektralbereich von 380 nm bis 580 nm - analysiert. Das resultierende Exzitationsspektrum ist exemplarisch für das Fluorchinolon C2 dargestellt (s. Abb. 3.4.2.1).

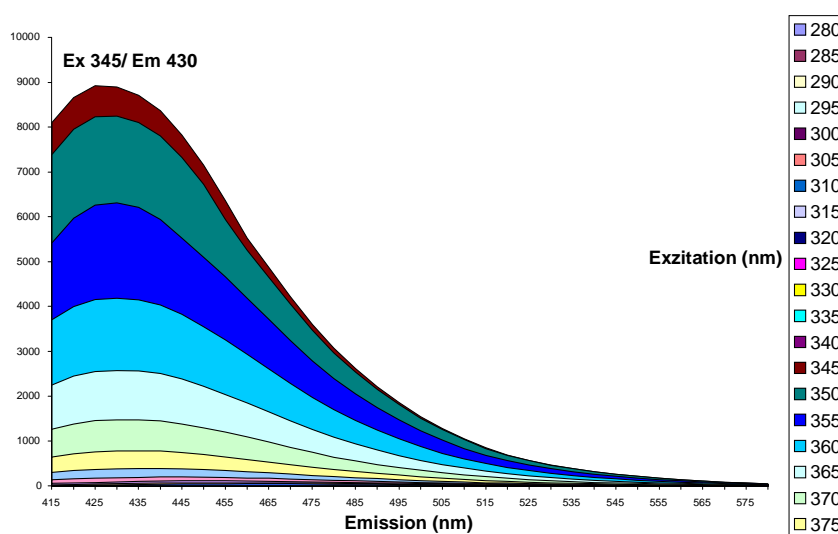


Abbildung 3.4.2.2 Emissionsspektrum des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 Die strahlungsinduzierte Emission wurde in Abhängigkeit von der Wellenlänge der Exzitationsstrahlung bei äquidistanten Wellenlängen in einem Spektralbereich von 415 nm bis 580 nm registriert. Die relative Intensität der Fluoreszenzstrahlung wurde als Funktion der Wellenlänge dargestellt, wobei die Bereiche einheitlicher Färbung identische Werte der Fluoreszenzintensität repräsentieren.

Die Analyse der Fluorchinolon-spezifischen Emission erfolgte in Analogie zu der Aufnahme des Exzitationsspektrums nicht ausschließlich bei der Wellenlänge maximaler Fluoreszenzanregung, sondern wurde kontinuierlich in 5 nm-Inkrementen über den für die einzelnen Fluorchinolon-Derivate relevanten Spektralbereich von 380 nm bis 580 nm registriert (s. Abb. 3.4.2.2). Die maximale Absorption der Anregungsstrahlung erfolgte in der Regel in dem nicht sichtbaren Bereich des UV-Spektrums innerhalb eines Wellenlängen-Intervalls von 345 nm bis 365 nm.

Die computergesteuerte Auswertung der registrierten Fluoreszenzsignale ermöglichte die simultane Darstellung der korrespondierenden Exzitations- und Emissionsmaxima als drei- bzw. zweidimensionale *Contour-Plots*, definiert als *2D-* bzw. *3D-Scans* (s. Abb. 3.4.2.3 (A) und (B)). Basierend auf dieser topologischen Charakterisierung der Intensitätsverteilung

und der farbcodierten Abbildung der relativen Fluoreszenzintensität war es möglich, insbesondere bei der Existenz mehrerer Emissionsmaxima, die qualitative und quantitative Fluoreszenzaktivität anschaulicher zu dokumentieren (s. Abb. 3.4.2.3 (A) und (B)).

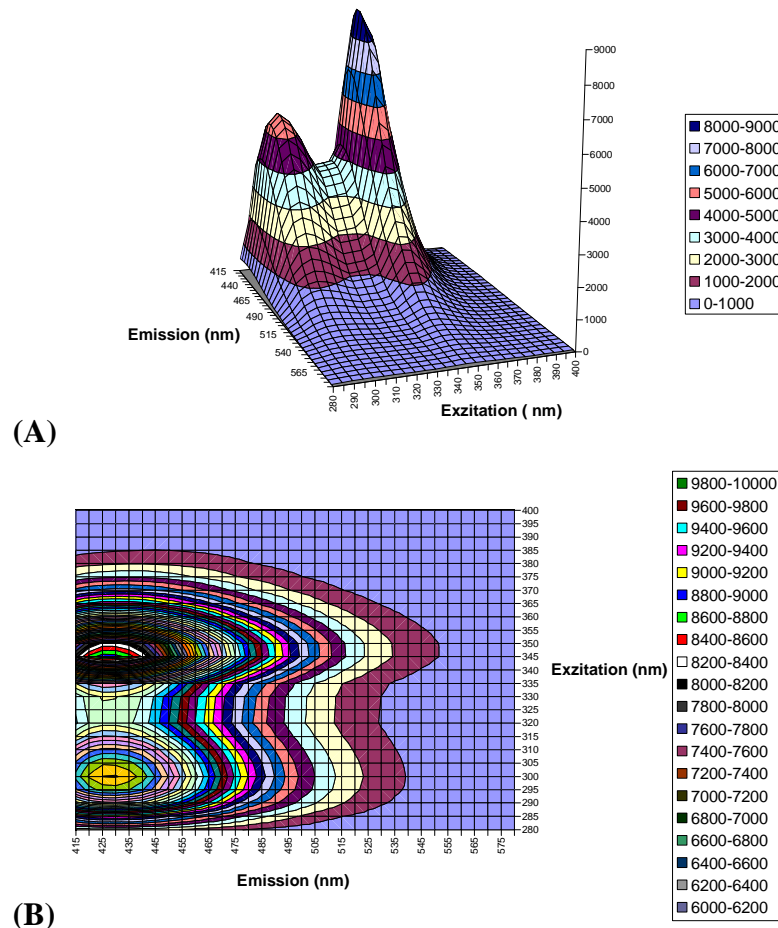


Abbildung 3.4.2.3 3D- bzw. 2D-Scan des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 Bei äquidistanten Wellenlängen wurde über das gesamte Exzitationsintervall von 280 nm bis 400 nm die emittierte Fluoreszenzintensität registriert und in Abhängigkeit von der Emissionswellenlänge in einem Spektralbereich von 415 nm bis 580 nm topologisch als zweidimensionaler Contour-Plot (2D-Scan) (B) bzw. dreidimensionaler 3D-Scan (A) dargestellt. Die bei den Wellenlängenpaaren Ex 300 nm/ Em 430 nm und Ex 345/ Em 430 lokalisierten Peaks kennzeichnen Maxima der Fluoreszenzintensität. Die im weitesten Sinne konzentrisch angeordneten Bereiche identischer Färbung repräsentieren definierte Werte der relativen Fluoreszenzintensität.

3.5 Ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie

Die mikrofluorimetrischen Messungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration erfolgte nach dem von Grynkiewicz entwickelten Prinzip (Grynkiewicz et al., 1985), das auf einem so genannten 2λ -Verfahren bzw. dem „excitation-ratioing“ beruht. Der Terminus leitet sich von der Möglichkeit ab, die endogene Fluoreszenz eines Ca^{2+} -sensitiven Indikators, i.e.

Fura-2, bei zwei verschiedenen Wellenlängen λ_1 und λ_2 anregen zu können. Die Bildung der Ratio (*ratioing*) aus den voneinander unabhängigen Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 bezieht sich ausschließlich auf die Ca^{2+} -Konzentration, ohne durch die Konzentration des Indikators und die physiologischen Variationen des Zellvolumens und anderer äußerer Parameter beeinflusst zu werden. Die Grundlagen und die messtechnische Realisierung dieses 2λ -Verfahrens sollen nachfolgend näher erläutert werden.

3.5.1 Der Fluoreszenzindikator Fura-2

Mitte der achtziger Jahre gelang es Wissenschaftlern, fluoreszierende Moleküle mit einer hohen Affinität gegenüber bi- bzw. trivalenten Kationen zu synthetisieren, die infolge der Komplexbildung mit den Ionen ihre Fluoreszenzeigenschaften ändern (Kasten, 1993). Besondere Bedeutung erlangte der in einer Gruppe um Tsien entwickelte Ca^{2+} -sensitive Indikator Fura-2, mit dem die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration unabhängig von der Konzentration des Indikators messbar wurde (Tsien, 1982).

Die Fähigkeit, Fluoreszenzstrahlung zu emittieren, setzt definierte strukturelle Eigenschaften des Chromophors (syn. Fluorophor) voraus, welche die Wahrscheinlichkeit einer elektromagnetisch oder mechanisch induzierten Elektronenanregung ($n \rightarrow \pi^*$ - bzw. $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergänge) wesentlich erhöhen. Als begünstigende Faktoren sind die Existenz eines delokalisierten π -Elektronensystems und die starre räumliche Anordnung der Atome innerhalb des Moleküls aufzufassen, die unter anderem in den planaren Strukturen mono- bzw. polycyclischer Aromaten und in den anellierten Ringsystemen zahlreicher Heteroaromaten (Pyridin, Indol, Chinolin, Imidazol, etc.) vorliegen. Molekülstrukturen mit konjugierten Doppelbindungen sowie Carbonyl-Funktionen oder anderen Auxochromen, *i.e.* funktionelle Gruppen mit freien Elektronenpaaren, fluoreszieren bei einer geeigneten Kombination mit entsprechenden Struktursequenzen oder durch die Bildung von Chelatkomplexen mit mehrwertigen Ionen.

Diese strukturellen Voraussetzungen werden von dem Ca^{2+} -selektiven Fluoreszenzindikator Fura-2, auch unter der Trivialbezeichnung 5-Oxazolcarbonsäure bekannt, erfüllt. Der Heteroaromat wurde ursprünglich von dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA abgeleitet und ist neben der optisch aktiven Stilben-Komponente durch fünf Carboxyl-Gruppen gekennzeichnet (Grynkiewicz et al., 1985). Diese verleihen dem Indikator gegenüber bi- und trivalenten Ionen ausgeprägte Chelatierungseigenschaften, wobei die relativ hohe Affinität zu freien Ca^{2+} -Kationen dominiert. Als Konsequenz der resultierenden Ca^{2+} -Chelierung wird

sowohl die qualitative als auch quantitative Fluoreszenzaktivität des Indikators einer deutlichen Änderung unterzogen (Takahashi et al., 1999).

Im Gegensatz zu anderen Fluorochromen (Indo-1, Rhod-2, etc.), die sich ebenfalls für die Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration etabliert haben, erscheinen in dem Absorptionsspektrum des Fura-2 zwei definierte Exzitationsmaxima, wobei die Anregungseffizienz einer signifikanten Ca^{2+} -Abhängigkeit unterliegt. In Gegenwart hoher Ca^{2+} -Konzentrationen dominiert das Exzitationsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda_1 = 335$ nm, während bei einer sehr geringen Konzentration das Maximum bei einer Wellenlänge von $\lambda_2 = 362$ nm lokalisiert ist (s. Abb. 3.5.1).

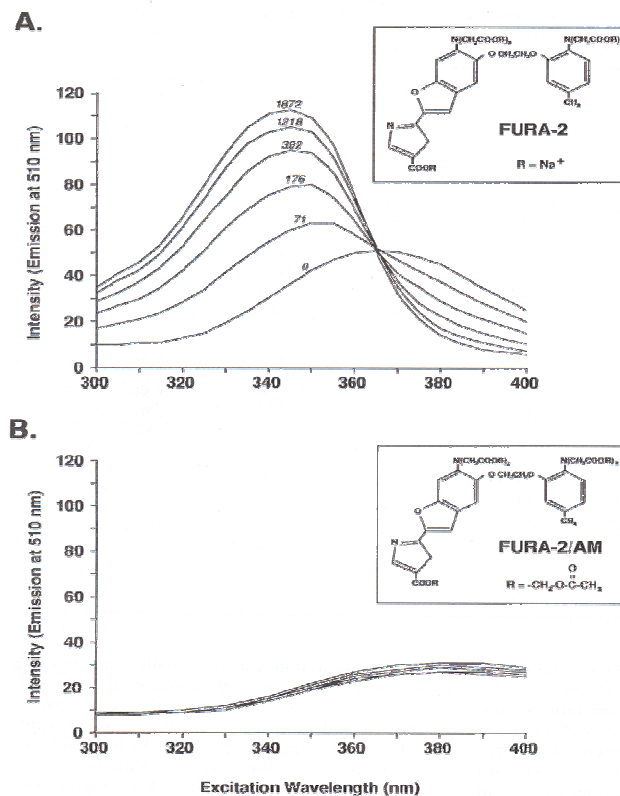


Abbildung 3.5.1 Emissionsspektrum des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikators Fura-2 in Gegenwart variabler Ca^{2+} -Konzentrationen Der Indikator wurde Mitte der achtziger Jahre von dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA abgeleitet. Die Empfindlichkeit des Fluorophors gegenüber freien Ca^{2+} -Kationen ist bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm am intensivsten ausgeprägt (Spektrum A), so dass die bei diesen Wellenlängen resultierenden Fluoreszenzintensitäten (gemessen bei $\lambda_{\text{Em}} = 510$ nm) für die digitale bildgesteuerte Berechnung der Fura-2-Fluoreszenz-Ratio $R = F_{340}/F_{380}$ herangezogen werden. Der Acetoxymethylester des Chromophors Fura-2 demonstriert in dem dargestellten Fluoreszenzspektrum (B) eine deutliche Unabhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration in dem Medium. Die Zahlenwerte repräsentieren definierte Konzentrationen an freien Ca^{2+} -Kationen (μM) in dem Medium (Mason et al., 1993).

Die korrespondierende Emissionsstrahlung ist demgegenüber von der Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen relativ unabhängig und erscheint in dem VIS-Bereich bei einer Wellenlänge von 505 nm bzw. 510 nm (Haugland, 1993; Takahashi et al., 1999). Dieses Phänomen ermöglicht die Messung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz bei zwei verschiedenen Wellenlängen (2 λ -Verfahren) und bildet dementsprechend die Grundlage des erwähnten „*excitation-ratioing*“.

Für die Charakterisierung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgt die Exzitation des Indikators bevorzugt bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm (Grynkiewicz et al., 1985), da sich bei diesen definierten Wellenlängen die größten Differenzen zwischen den Intensitäten der emittierten Fluoreszenzemissionen ergeben, was durch die Darstellung in einem entsprechenden Absorptionsspektrum leicht nachzuvollziehen ist (s. Abb. 3.5.1). Bei der Wellenlänge $\lambda_1 = 340$ nm verhält sich die Steigerung der Fluoreszenzintensität F_{340} direkt proportional zu der Ca^{2+} -Konzentration, während bei der Wellenlänge $\lambda_2 = 380$ nm die Fluoreszenzintensität F_{380} mit steigender Ca^{2+} -Konzentration geringfügig reduziert wird. Demgemäß reagiert die bei 340 nm induzierte Fluoreszenzemission wesentlich sensibler auf Änderungen der freien Ca^{2+} -Konzentration, als die zu 380 nm korrespondierende Fluoreszenzintensität. Implizit ermöglicht die Ratiobildung (*Ratioing*) aus den bei diesen definierten Wellenlängen angeregten Fluoreszenzemissionen die präzise Charakterisierung der intrazellulären Ca^{2+} -Verhältnisse, ohne die Konzentration des Indikators, ungleichmäßige Beladungen des Zellmaterials, physiologische Variationen des Zellvolumens oder andere Indikator-abhängige Effekte („*photobleaching*“; „*dye-leakage*“) berücksichtigen zu müssen. Dieser Sachverhalt erklärt die Bedeutung des Indikators für die „*fluorescence ratio imaging*“-Technik.

3.5.2 Die Inkubation der Langerhans-Inseln bzw. endokrinen B-Zellen mit dem ratiometrischen Fluoreszenzindikator Fura-2

Aufgrund der fünffachen Carboxylierung des 5-Oxazolcarbonsäure-Derivats handelt es sich bei dem Indikator um ein sehr polares Molekül. Aus diesem Grund ist für die Inkubation der einzelnen B-Zellen, die auf der passiven Diffusion des Fluoreszenzindikators in das Zytoplasma basiert, eine entsprechende Modifizierung notwendig. Durch die Veresterung der freien Carboxyl-Funktionen mit Bromomethoxyacetat werden dem Molekül lipophile Eigenschaften verliehen, so dass die notwendige Erhöhung der Penetrationsrate realisiert wird. Der Efflux des Acetoxymethylesters (AM) des Indikators infolge stationärer Gleichgewichtseinstellungen wird durch die enzymatische Hydrolyse des mehrwertigen Esters durch unspezifische Esterasen des Zytosols verhindert; auf diese Weise resultiert die

irreversible Akkumulation einer effektiven Indikatorkonzentration in dem Zytoplasma der isolierten B-Zellen („*indicator-trapping*“).

In diesem Zusammenhang ist der Zeitraum der Inkubation als kritischer Faktor anzusehen, da infolge einer zu extensiven Diffusion des Acetoxymethylesters in das Zytosol die Übersättigung der Enzymkapazität provoziert werden könnte. Als Konsequenz wäre die Sequestrierung der lipophilen Form des Fluoreszenzindikators innerhalb der Mitochondrien und anderer Organelle oder die Rückdiffusion in den extrazellulären Raum zu erwarten. Dieser passive Efflux des Indikators wird zusammen mit aktiven Transportprozessen via transmembranärer Carrier-Systeme unter dem Terminus „*leakage*“ des Indikators zusammengefasst.

Aus den genannten Gründen und um das Ausmaß der Formaldehyd-Freisetzung während der Esterhydrolyse auf ein Minimum zu limitieren, ist die Indikatorkonzentration in den Inkubationsmedien so gering wie möglich einzustellen - in der Regel in einem Bereich von 0,5 μM bis maximal 5 μM (Molecular Probes). Unter diesen Voraussetzungen ist von einer hinreichend genauen Analyse der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration innerhalb isolierter Zellen bzw. Zellaggregate auszugehen.

3.5.2.1 Inkubation der isolierten B-Zellen mit dem Acetoxymethylester des Ca^{2+} -selektiven Fluoreszenzindikators Fura-2

In dieser Arbeit wurde das konventionelle Verfahren der Zell-Inkubation eingesetzt, bei dem die auf Deckgläschen (Borosilikatglas) bzw. direkt innerhalb der Zellkulturschalen aus inertem Kunststoff gezüchteten und von dem Kultivierungsmedium gereinigten B-Zellen mit dem Acetoxymethylester des Indikators inkubiert wurden. Dieser Prozess erfolgte innerhalb einer auf 37 °C temperierten Kammer unter Ausschluss von Lichteinstrahlung. Das verwendete Inkubationsmedium enthielt neben dem Indikator Fura-2/AM einen mäßig effektiven Glucose-Stimulus (10 mM), um den Energiemetabolismus der endokrinen Zellen für die ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen moderat anzuregen. Der Zeitraum der Fluoreszenzmarkierung wurde auf 35 Minuten limitiert, da die Esterhydrolyse durch die endogenen Esterasen der B-Zelle mit einer schnellen Kinetik innerhalb der ersten 5 bis 30 Minuten erfolgt (Mason et al., 1993).

3.5.2.2 Inkubation der isolierten Langerhans-Inseln mit dem Acetoxymethylester des Fluoreszenzindikators Fura-2

Die Inkubation der kultivierten Pankreasinseln erfolgte nach dem gleichen Prinzip, das bei der Fluoreszenzmarkierung der isolierten B-Zellen zur Anwendung kam. Die

Inkubation mit dem Indikator wurde jedoch aufgrund des komplexen Zellmaterials in einem Zeitraum von 45 Minuten durchgeführt. Während dieser Beladungsphase herrschten euglykämische Bedingungen (5 mM Glucose, Matschinsky, 1995), damit eine ausreichende Ansprechbarkeit der empfindlichen Zellaggregate gegenüber dem externen K^+ -Stimulus bzw. den Testsubstanzen während der ratiometrischen Messungen gewährleistet werden konnte.

3.5.2.3 Simulierte Inkubation der isolierten B-Zellen in Abwesenheit des Fluoreszenzindikators Fura-2

Für die Analyse der endogenen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone sowie der Zell-abhängigen Autofluoreszenz wurde die Inkubation der B-Zellen unter identischen Bedingungen (s. unter 3.5.2.1), jedoch in Abwesenheit des Fluoreszenzindikators Fura-2 simuliert. Die Konzentration des Indikators wurde durch ein adäquates Volumen des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers substituiert.

3.5.3 Versuchsanordnung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie

3.5.3.1 Quelle der Exzitationsstrahlung und Anregung des Fluoreszenzindikators

Für die Durchführung der Fluoreszenzmessungen wurde als Exzitationsquelle eine leistungsstarke Hochdruckgasentladungslampe gewählt, die zwei wichtige Voraussetzungen für die Durchführung des Exzitations-Rationing erfüllt:

- 1) in dem Emissionsspektrum sind die Anregungswellenlängen des Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzindikators Fura-2 lokalisiert
- 2) innerhalb des gewählten Wellenlängen-Intervalls ist eine nahezu konstante Fluoreszenzanregung gewährleistet

Als besonders geeignet erwies sich das kontinuierliche Emissionsspektrum der Xenon-Lichtbogenlampe (150 Watt, Fa. Hamatsu, Japan), das von einzelnen Spektrallinien überlagert wird und sich durch eine relativ konstante Strahlungsintensität in dem Wellenlängenbereich von ungefähr 300 nm bis 650 nm auszeichnet.

Die Exzitation des ratiometrischen Fluoreszenzindikators Fura-2 bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm beruhte auf der Projektion der selektierten Anregungsstrahlung auf zwei separate Lichtleiter, die direkt in das Lampenhaus eines Epifluoreszenzmikroskops eingekoppelt wurden. Der zeitgesteuerte Verschluss dieser speziellen aus Quarzfasern gefertigten Lichtleiter erfolgte mit Hilfe programmierbarer Schnellverschlüsse (Uniblit-Shutter mit VVMD-1-Kontrolleinheit), die eine zeitgesteuerte Öffnung mit einer einminütigen

Frequenz ermöglichen. Die von der Lichtbogenlampe emittierte Exzitationsstrahlung wurde mit der vorgegeben Taktfrequenz auf das Beugungsgitter projiziert, an dessen Kanten die Strahlung monochromatisch zerlegt und über die Quarzfaserlichtleiter in einem 90°-Winkel in den Strahlengang des Epifluoreszenzmikroskops gelenkt wurde.

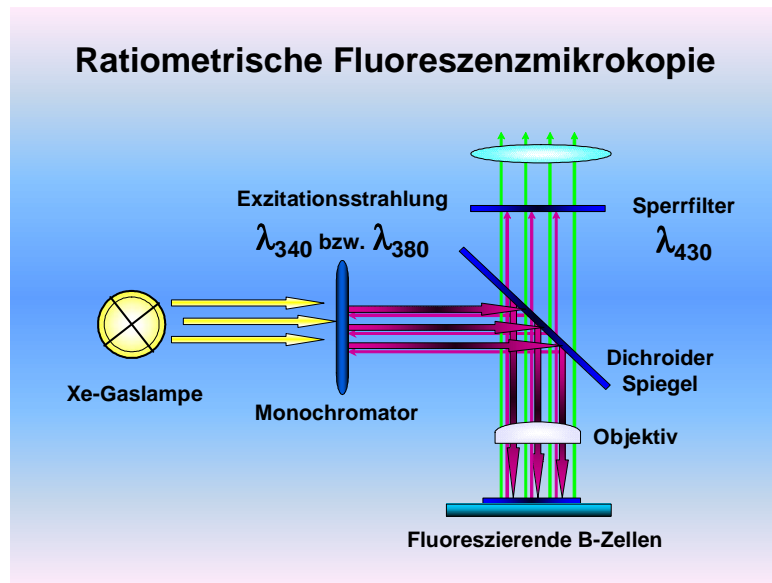


Abbildung 3.5.3.1 Strahlengang durch das Epifluoreszenzmikroskop (Ploem, 1993) Die Messung der emittierten Fluoreszenz wurde senkrecht zu der Ebene der Anregungsstrahlung durchgeführt, die von einer leistungsstarken Hochdruckgasentladungslampe erzeugt wurde. In der für die ratiometrischen Perifusionsmessungen gewählten Versuchsanordnung wurde eine Xenon-Lichtbogenlampe in Kombination mit einem optischen Gitter als Monochromator eingesetzt. Die zentrale Komponente des Epifluoreszenzmikroskops wird durch den als „chromatic beam splitter“ bezeichneten Strahlungsteiler bzw. dichroiden Spiegel repräsentiert, der die Dissoziation zwischen der energiereichen Exzitationsstrahlung und der um den Faktor 1000 schwächeren Emissionsstrahlung ermöglichte. (Nähere Erläuterungen folgen in dem Text).

3.5.3.2 Strahlengang durch das Epifluoreszenzmikroskop

Für die mikrofluorimetrischen Messungen wurde das von der Firma Leitz konstruierte „Orthoplan“ eingesetzt, welches durch die Variabilität der einzelnen Module (Stativ, Revolver, Wahl der Farbteilerspiegel, etc.) sowohl als Durchlichtmikroskop als auch als Epifluoreszenzmikroskop verwendbar ist. Die Vorteile der Auflichtfluoreszenz ergeben sich aus der Erfordernis nur eines optischen Elementes, das sowohl für die Fokussierung der Anregungsstrahlung auf das Objekt (Kondensorfunktion) als auch die Absorption der emittierten Fluoreszenzstrahlung (Funktion als Objektiv) verantwortlich ist. Als Objektiv fungierte in diesem Sinne ein Zeiss „Fluar“-Objektiv mit 40facher Vergrößerung, das bei einer Wellenlänge von ungefähr 340 nm durch eine hohe Transmission gekennzeichnet ist, so

dass lediglich von einem geringfügigen Intensitätsverlust der Emissionsstrahlung ausgegangen werden konnte. Ein weiterer Vorteil dieser Meßanordnung war die Verwendbarkeit des Objektivs unter Immersionsbedingungen, wodurch die Lichtsammelkraft des Linsensystems als auch das Auflösungsvermögen erheblich gesteigert werden konnte. Für die ratiometrischen Perifusionsmessungen wurde das Fluar-Objektiv in der 40fachen Vergrößerung eingesetzt. Über das Immersionsöl ($n_D = 1,515$; Fa. Leitz, Wetzlar) wurde ein direkter Kontakt zwischen dem Objektiv und dem geschlossenen Perifusionssystem hergestellt, so dass in dieser Konfiguration eine gleichmäßige Erwärmung des Perifusionsmediums sowie der Umströmungs-Kammer innerhalb eines Temperatur-Intervalls von 35 °C bis 37 °C realisiert werden konnte.

Die Dissoziation der nahezu 1000fach stärkeren, nicht absorbierten Exzitationsstrahlung von der wesentlich energieärmeren Emissionsstrahlung erfolgte auf der Grundlage des Stoke-Shift durch die Integration eines dichromatischen Strahlenteilers („*beam splitter*“) in den Strahlengang (s. *Abb.3.5.3.1*). Diese, auch als dichroider Spiegel bezeichnete, optische Komponente wurde oberhalb des Objektes in einem 45°-Winkel zu der optischen Achse positioniert und ermöglichte die Reflexion der hochfrequenten Exzitationsstrahlung (< 430 nm) aus dem Strahlengang des Epifluoreszenzmikroskops, während die energiearme Fluoreszenzstrahlung (> 430 nm) auf einen Langpass-Emissionsfilter (430 nm) gelenkt wurde. Der Terminus Langpass deutet auf die Eigenschaft des Filters hin, energiearme Fluoreszenzstrahlung geringer Frequenz passieren zu lassen, wohingegen das Filter für hochfrequente, energiereiche Strahlung nicht permeabel ist und diese wie an einem Spiegel reflektiert wird.

3.5.3.3 Registrierung der Fluoreszenzstrahlung durch digitale Bildverarbeitung

Als bildgebender Detektor fungierte in der angewandten Versuchsanordnung eine „*slow scan CCD*“ („*charged coupled devices*“)-Kamera. Der Terminus „*slow scan*“ bezieht sich auf die moderate bis geringe zeitliche Auflösung der Signale, deren Registrierung in größeren Zeitabständen erfolgt - in der Regel mit einer Frequenz von 10/sec bis 1/min. Auf diese Weise wird eine effektive Akkumulation der Lichtsignale bzw. emittierten Photonen und explizit eine höhere Empfindlichkeit erzielt. Die Photonen der Fluoreszenzstrahlung werden von den feldartig angeordneten Ladungsspeicherzellen, die sich auf dem integrierenden *CCD*-Chip befinden, durch so genannte „*on chip*“-Integration registriert und in einem diskreten Impuls transformiert. Häufig werden diese Speicherzellen auch als Pixel („*picture elements*“) bezeichnet, die nach erfolgter Belichtung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten separat ausgelesen werden können.

Basierend auf diesem Prinzip wurde die pro Speicherzelle resultierende Fluoreszenz-Ratio durch Pixel-pro-Pixel-Division berechnet und in adäquate Bildelemente umgesetzt, die in ihrer Gesamtheit die grün fluoreszierenden Einzelzellen bzw. Langerhans-Inseln darstellten. Dieses Verfahren ermöglichte die simultane Analyse von maximal 16 isolierten B-Zellen. Die Kinetik der einzelnen Fluoreszenzmessungen wurde durch den Einsatz eines speziellen Computerprogramms (*Fucal*, Fa. Till photonics, Planegg) direkt aus den registrierten und digitalisierten Ratio-Werten erstellt. Für die Berechnung der Mittelwerte wurden insgesamt 20 bis maximal 30 Zellen aus drei Präparationen herangezogen, die in mindestens drei mikrofluorimetrischen Einzelmessungen analysiert wurden. Die entsprechenden Nettowerte bzw. Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio (\pm SEM) wurden mit dem Programm *GraphPad Prism* (Version 3.1, GraphPad, San Diego, USA) aus den Kinetiken ermittelt und für die graphische Darstellung der Registrierungen bearbeitet.

3.5.3.4 Charakterisierung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Durch die zahlreichen Faktoren, welche die Fluoreszenzintensität beeinflussen, ist eine absolute Messung der Ca^{2+} -Konzentration nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgt die quantitative Analyse in der Regel unter Verwendung von Vergleichslösungen oder durch intrazelluläre Kalibrierungen. Auf diese Weise werden die Störfaktoren, die zu einer uneinheitlichen Verminderung der Quantenausbeute führen (pH-Wert, Einflüsse des Lösungsmittels bzw. Perifusionsmediums, Absorptionen durch das Gewebe bzw. Zellen sowie die optischen Komponenten des Mikroskops, Rauschen des Photodetektors, „bleaching“ des Fluorophors; Takahashi et al., 1999) in einem ausreichenden Maße berücksichtigt. Als Berechnungsgrundlage der Ca^{2+} -Konzentration, die in dem Zytosol der isolierten B-Zellen vorliegt, dient die folgende Gleichung:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d Q (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

- K_d : Dissoziationskonstante des Ca^{2+} -Fura-2-Chelates ($K_d = 0,14 \mu\text{M}$)
- Q : $Q = F_{\min}/F_{\max}$ (Ratio aus F_{\min}/F_{\max} bei einer Wellenlänge von $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$); F_{\min} repräsentiert die Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von Ca^{2+} , F_{\max} definiert die in Gegenwart einer hohen Ca^{2+} -Konzentration resultierende Fluoreszenzintensität
- R : $R = F_{340}/F_{380}$ (Ratio der Fluoreszenz bei $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$)
- R_{\min} : minimale registrierte Fluoreszenzratio $R_{\min} = F_{\min,340}/F_{\min,380}$ (Ca^{2+} -freie Lösung)

- R_{\max} : maximale registrierte Fluoreszenzratio $R_{\max} = F_{\max,340}/F_{\max,380}$ (in Anwesenheit einer definierten Ca^{2+} -Konzentration)

In dieser Arbeit wurde auf die Durchführung einer *in situ*-Kalibrierung verzichtet, da als Konsequenz der Glucose-induzierten Aktivierung der endokrinen B-Zelle bzw. der Pankreasinseln uneinheitliche Ca^{2+} -Konzentrationen in dem Zytosol vorliegen (Simpson, 1999). Das resultierende fluktuierende Verteilungsprofil wurde in zahlreichen Studien als Ca^{2+} -Oszillationen bzw. „ Ca^{2+} -waves“ charakterisiert (Grapengiesser et al., 1988, Pralong et al. 1990). Als ursächlicher Mechanismus werden unter anderem die IP_3 -vermittelte Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus den Speicherorganellen (ER, SR), die ATP-abhängige Kompartimentierung via Ca^{2+} -ATPasen (SERCA, etc.) innerhalb intrazellulärer Mikrokompimente (SR, ER, Mitochondrien), die intrazelluläre Pufferung freier Ca^{2+} -Ionen durch zytosolische Proteine (Parvalbumin, etc.) sowie die Ca^{2+} -induzierte Aktivierung spezifischer Ionenkanäle, zum Beispiel Ca^{2+} -abhängiger K^+ -Kanäle (BK, IK und SK), diskutiert. Dementsprechend wurde die Änderung der freien Ca^{2+} -Konzentration in dem Zytosol der B-Zellen als Fura-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert.

3.5.4 Praktische Durchführung der ratiometrischen Fluoreszenzmessungen

Die Perifusion der Fura-2-inkubierten B-Zellen mit dem Krebs-Ringer-Basismedium, das entsprechend den Vorgaben des Versuchsprotokolls durch den Zusatz der jeweiligen Testsubstanzen modifiziert wurde, erfolgte in einem geschlossenen System. Dieses wurde durch eine speziell konstruierte Kunstharzkammer dargestellt, auf der das Deckgläschen mit den kultivierten B-Zellen bzw. den solitären Langerhans-Inseln fest fixiert werden konnte. Die zentrale Vertiefung der Kammer wurde über einen separaten Zu- und Ablauf, die aus Metallkapillaren konstruiert waren, mit dem Medium kontinuierlich durchströmt. Das Deckgläschen mit den kultivierten Einzelzellen bzw. der zentral positionierten Pankreasinsel wurde derart oberhalb der Kammervertiefung positioniert, dass sich die Zellen in Richtung der zuvor vollständig mit dem Krebs-Ringer-Basismedium befüllten Vertiefung orientierten. Um das System vollständig nach außen abzuschließen, musste der Kontakt zwischen der Perifusionskammer und dem Deckgläschen mit Hilfe eines inertem Vakuumfettes (Glisseal[®], Fa. Borer Chemie) verstärkt werden.

Die gleichmäßige Perifusion der isolierten Langerhans-Inseln bzw. der endokrinen B-Zellen mit einer definierten Durchflussrate von 189 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde mit Hilfe einer nachgeschalteten peristaltischen Pumpe (Varioperpex[®] II Pump, Fa. LKB) gewährleistet. Die einzelnen Gefäße mit den entsprechenden Versuchsmedien wurden unter Verwendung eines

Wärmebades auf 37 °C temperiert und mit einer Gasmischung aus 95 % O₂ und 5 % CO₂ begasten. Dieser Prozess erfolgte kontinuierlich während der gesamten neunzig bzw. achtzig Minuten umfassenden Perifusionsmessung, so dass auf diese Weise für die empfindlichen B-Zellen bzw. Langerhans-Inseln geeignete Versuchsbedingungen herrschten. Insbesondere für die funktionelle Integrität der Pankreasinseln war eine genaue Temperierung auf 37 °C erforderlich (Nadal et al., 1994), die über das Fluar-Objektiv realisiert wurde. Durch die Verwendung des Objektivs unter Ölimmersions-Bedingungen konnte ein direkter Kontakt zu der Perifusionskammer hergestellt und eine geeignete, durch Probemessungen mit Thermofühlern gesicherte Wärmeleitung gewährleistet werden. Unter der Voraussetzung einer geeigneten Temperierung des Mediums sowie des Immersions-Objektivs, herrschte in der unmittelbaren Nähe der Langerhans-Inseln eine nahezu konstante Temperatur von 35 °C bis 36 °C.

Die Aufnahme der Bildpaare bei den entsprechenden Anregungswellenlängen $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ - definiert als A- und B-Bild - erfolgte mit einer Frequenz von 1/min, wobei die Belichtung der Einzelbilder einen Zeitraum von 6000 ms umfasste. Unter diesen Bedingungen konnte ein Wechsel des Perifusionsmediums ohne zeitliche Verzögerung des Aufnahmetaktes durchgeführt werden. Dazu wurde der zuführende Versilic-Schlauch luftdicht verschlossen und bei gleichzeitig abgeschalteter Pumpe in das entsprechende Gefäß mit dem temperierten Perifusionsmedium eingeführt. Die gleichmäßige Durchströmung der Kammer musste für diesen Vorgang nur wenige Sekunden unterbrochen werden.

3.5.5 Auswahlkriterien für die „regions of interest“ (ROIs)

Die Auswahl der quantitativ auszuwertenden „regions of interest“ (ROIs) erfolgte nach dem Abgleich der Registrierungen mit dem zuvor aufgenommenen Nativbild der isolierten B-Zellen bzw. der Langerhans-Insel. Mit Hilfe eines Kobaltglases als optisches Filter und unter vollständiger Abblendung der Mikroskopbeleuchtung wurde der Kontrast der Zellpräparate derart erhöht, dass die Kontur der isolierten B-Zellen bzw. Insel visuell auf einem Schwarz-Weiß-Monitor dargestellt werden konnte.

Hinsichtlich der Auswahlkriterien geeigneter ROIs wurde der zentrale Bereich, vorzugsweise ovaler bis runder B-Zellen größeren Umfangs, die einen geringen Degranulations-Grad und eine undeformierte Membran aufwiesen, als eine ROI definiert. Bei den Pankreas-Inseln wurden entsprechend der morphologischen Verteilung der endokrinen B-Zellen, die in dem Zentrum der Inseln einen homologen Bereich bilden (Hellman, 1967; Orci et al., 1975), in der zentralen Region und in der unmittelbaren Umgebung sechs ROIs für die

quantitative Auswertung definiert (s. Kap. 4.2.3.2). Die peripheren Gebiete, in denen primär die endokrinen A- und D-Zellen sowie die PP-Zellen lokalisiert sind (Grube et al., 1983; Hellman, 1967), blieben dementsprechend unberücksichtigt.

Die registrierten Nativbilder dienten neben der Auswahl der ROIs als Kontrolle, um den Verlust oder den Positionswechsel der B-Zellen bzw. der zentral fokussierten Pankreasinsel während der Perifusion mit dem Testmedium feststellen zu können. In die Datenauswertung wurden ausschließlich Fluoreszenzmessungen einbezogen, bei denen die Positionen der B-Zellen bzw. der Pankreasinsel vor und nach Beendigung der Perifusion identisch waren. Die Korrektur der registrierten Kinetiken der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, die durch die intrinsische Fluoreszenz der Fluorchinolone nicht die realen Verhältnisse der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reflektierten, erfolgte durch das in dem nachfolgenden Kapitel 3.5.6 charakterisierte Prinzip.

3.5.6 Korrekturverfahren der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio und Berechnung der Ca^{2+} -regulierten Fura-Nettofluoreszenz-Ratio

Für die Korrektur der im Wesentlichen durch die Autofluoreszenz der untersuchten Fluorchinolone zusätzlich erhöhten Werte der Fura-Fluoreszenz-Ratio (Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio), war jeder Versuch unter identischen Bedingungen doppelt durchzuführen, zunächst mit Fura-2-inkubierten B-Zellen (s. Kap. 3.5.2.1) und nachfolgend mit schein-inkubierten B-Zellen, deren Fluorchromierung unter identischen Bedingungen in Abwesenheit des Indikators simuliert wurde (s. Kap. 3.5.2.3).

Die während der Perifusion der unbeladenen B-Zellen bei den Exzitationswellenlängen 340 nm (A-Bild) und 380 nm (B-Bild) registrierten Fluoreszenzintensitäten wurden von den entsprechenden Fluoreszenzemissionen, die unter Verwendung der Fura-2-inkubierten B-Zellen registriert wurden, subtrahiert. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, zu jedem Bruttowert der Fura-Fluoreszenz die korrigierte Nettofluoreszenz zu ermitteln, die das ausschließlich Ca^{2+} -abhängige Fura-2-Signal repräsentierte. Aus den für die jeweiligen Exzitationswellenlängen $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ berechneten Nettofluoreszenzintensitäten wurden im Anschluss daran die Ratio als Ausdruck „echter“ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signale gebildet.

In der nachfolgenden schematischen Übersicht (s. Abb. 3.5.6.1) wird das Prinzip, das der Dissoziation zwischen der Fluorchinolon-spezifischen Autofluoreszenz und der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio zu Grunde lag, exemplarisch für das Fluorchinolon Norfloxacin vorgestellt. Bei den Registrierungen handelt es sich um tatsächliche Versuchsergebnisse, die in dem Kapitel 4.2.4.2 explizit vorgestellt werden.

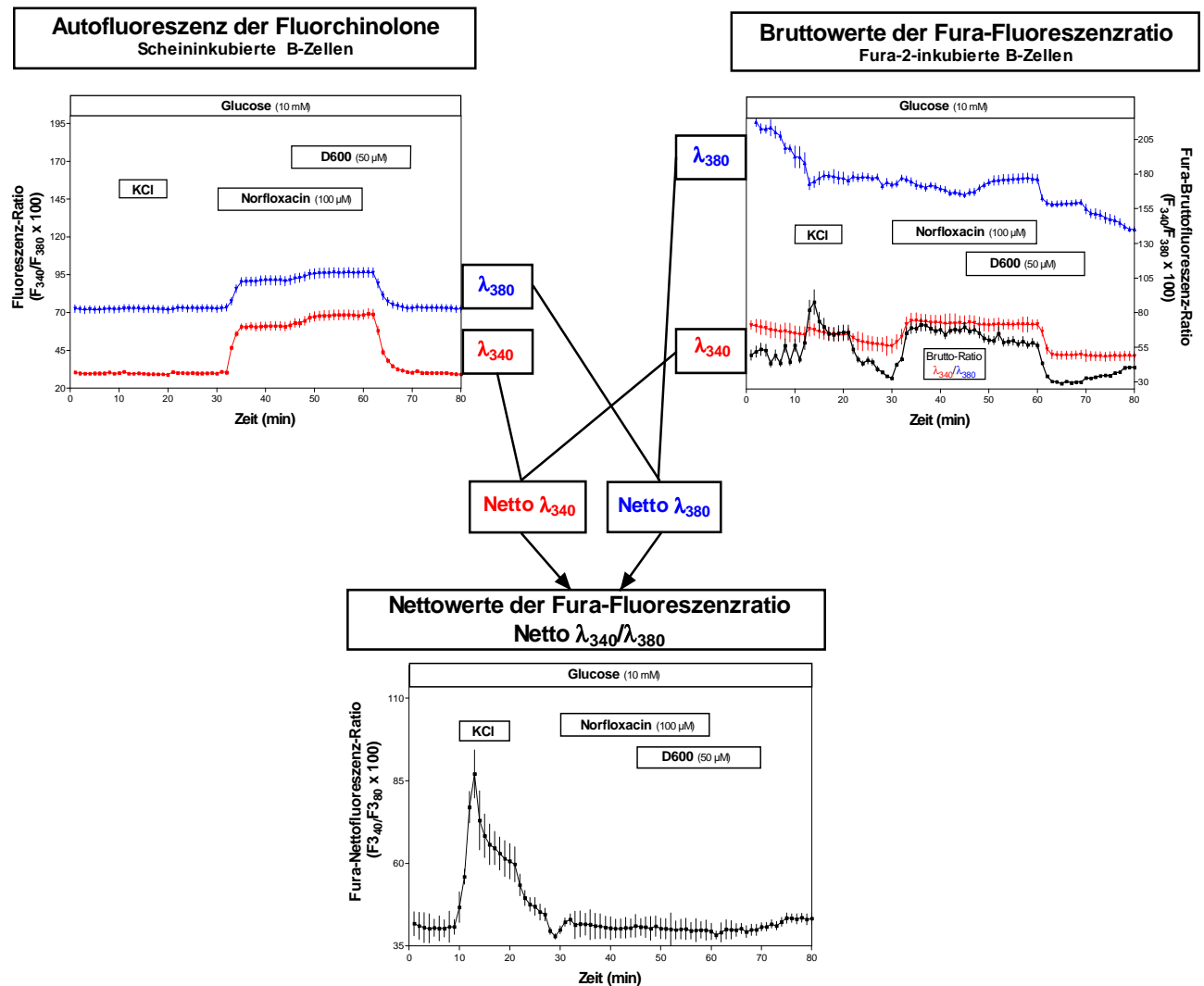


Abbildung 3.5.6.1 Dissoziation zwischen der Autofluoreszenz des Fluorchinolons Norfloxacin und der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio Jeder Berechnung der ausschließlichen Ca^{2+} -abhängigen Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Nettofluoreszenz-Ratio, lag ein Versuchszyklus aus zwei Einzelmessungen zu Grunde, in denen unmittelbar hintereinander Fura-2-inkubierte und schein-inkubierte B-Zellen unter identischen Bedingungen analysiert wurden. Die jeweils pro Minute bei einer Exzitationswellenlänge von 340 nm (λ_{340} , A-Bild) bzw. 380 nm (λ_{380} , B-Bild) induzierte Autofluoreszenz des Fluorchinolons wurde von der jeweiligen unkorrigierten Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 - definiert als Fura-Bruttofluoreszenz - subtrahiert. Aus den resultierenden Nettofluoreszenzemissionen der korrespondierenden A- und B-Bilder, in dem Schema als Netto λ_{340} bzw. Netto λ_{380} bezeichnet, wurde jeweils die Ratio pro Minute gebildet. Der Vergleich zwischen dem Signalprofil der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio (rechtes Diagramm des Schemas) und dem Kurvenprofil der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (unteres Diagramm) demonstriert die erfolgreiche Dissoziation der intrinsischen Fluoreszenz des Fluorchinolons Norfloxacin von der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2. Die in den einzelnen Messdiagrammen vorgestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, die aus den in drei Einzelperfusionen registrierten Daten berechnet wurden.

Die unkorrigierte Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 3.5.6.2 (A)) und die ausschließlich Ca^{2+} -regulierte Modulation der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 3.5.6.2 (C)) werden in Relation zueinander in der auf Seite 70 dargestellten Reihenfolge - exemplarisch für das Fluorchinolon Lomefloxacin demonstriert - vorgestellt. Auf die Darstellung der endogenen Fluoreszenzemission der einzelnen Fluorchinolone und der entsprechenden Ratio (s. Abb. 3.5.6.2 (B)) wird in der Regel aus Platzgründen verzichtet. Hinsichtlich der sehr konstanten Intensität der von dem angeregten Fluorchinolon emittierten Fluoreszenzstrahlung konnten photochemische Zersetzungsprozesse oder Beeinflussungen der Fluoreszenzemission durch variable Ca^{2+} -Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Für die Berechnung valider Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio mit positiven Vorzeichen wurde - entsprechend dem Übersicht-Schema (Abb. 3.5.6.1) - zunächst die bei der Exzitationswellenlänge $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ bzw. $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ angeregte Autofluoreszenz des Fluorchinolons von der entsprechenden Bruttofluoreszenz des Ca^{2+} -sensitiven Indikators Fura-2 subtrahiert. Aus den resultierenden Fluoreszenzintensitäten F_{340} und F_{380} wurde die Ratio gebildet, die demzufolge die korrigierten Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio repräsentiert.

Legenden der Abbildungen 3.5.6.2 (A) bis (C)

Abbildung (A) Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio

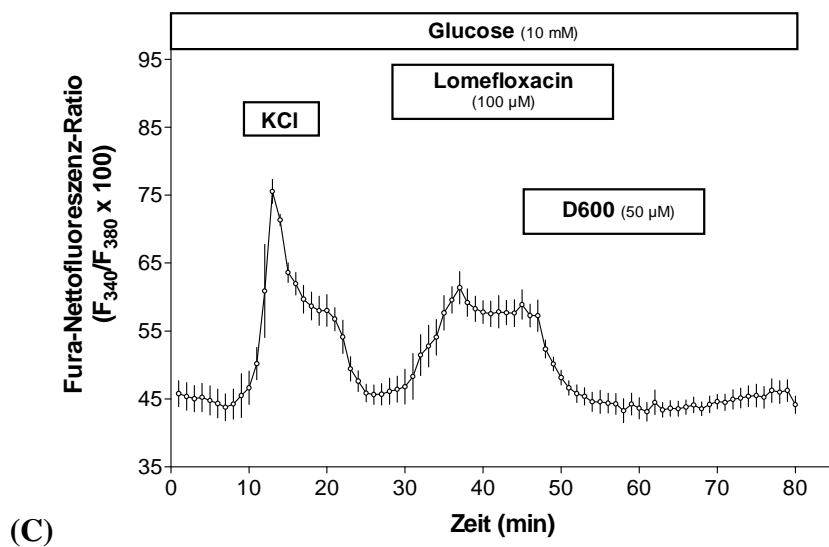
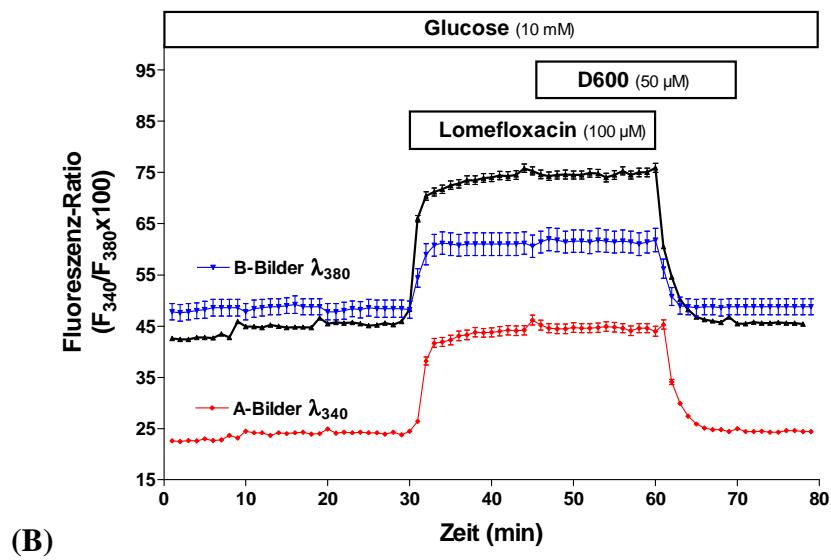
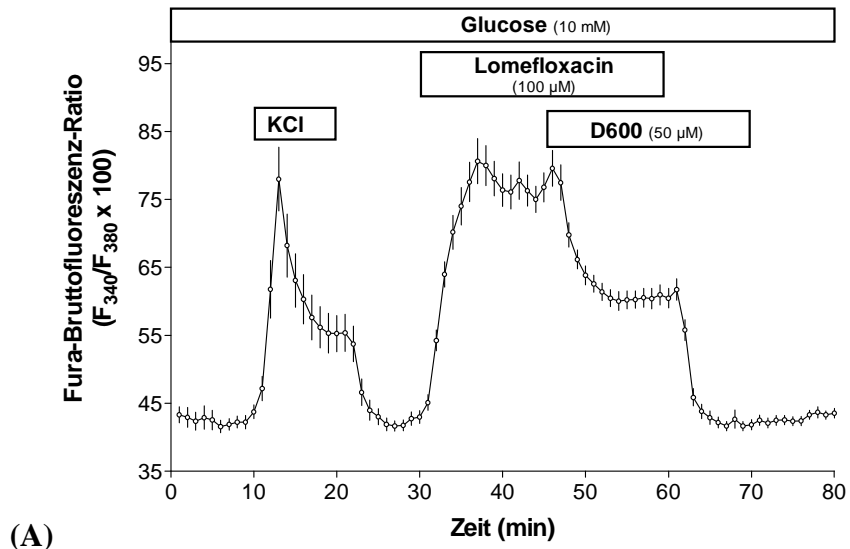
Die Fluoreszenzsignale umfassen sowohl die Ca^{2+} -abhängige Modulation der Fura-Fluoreszenz-Ratio als auch die Ratio der Lomefloxacin-spezifischen Autofluoreszenz und repräsentieren daher die Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio. Die in dem Diagramm dargestellten Mittelwerte $\pm \text{SEM}$ wurden aus drei mikrofluorimetrischen Einzelmessungen berechnet, in denen insgesamt 24 primär kultivierte und Fura-2-inkubierte B-Zellen aus drei unterschiedlichen Präparationen perfundiert wurden.

Abbildung (B) Endogene Fluoreszenzemission des Fluorchinolons Lomefloxacin

Die dargestellten Versuchsdaten wurden während der Perfusion schein-inkubierter, d.h. nicht mit dem Indikator Fura-2 beladener B-Zellen, aus drei Einzelmessungen ermittelt. Die zu der Exzitationswellenlänge 340 nm (blau) bzw. 380 nm (rot) korrespondierende Intensität der Autofluoreszenz wurde mit einer Frequenz von 1/min registriert. Für die Berechnung der in dem Diagramm vorgestellten Mittelwerte $\pm \text{SEM}$ wurden insgesamt 24 endogene B-Zellen analysiert, die aus drei verschiedenen NMRI-Albinomäusen isoliert wurden.

Abbildung (C) Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio

Die in dem Diagramm präsentierten Daten stellen die korrigierten Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio - definiert als Fura-Nettofluoreszenz-Ratio - dar. Die Dissoziation zwischen der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 und der endogenen Fluoreszenz des Fluorchinolons Lomefloxacin erfolgte nach dem in Kapitel 3.5.6 erläuterten Korrekturverfahren. Die Mittelwerte $\pm \text{SEM}$ wurden aus drei Versuchszyklen berechnet, in denen insgesamt 24 schein-inkubierte bzw. Fura-2-inkubierte B-Zellen aus drei Präparationen perfundiert wurden.



3.6 Elektrophysiologische Messungen des Membranpotentials isolierter B-Zellen des Pankreas in dem *whole cell*-Modus

Um die Fluorchinolon-induzierte Modulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration eindeutiger interpretieren und Relevanzen für die Inhibierung des K_{ATP} -Kanals beurteilen zu können, wurde die depolarisierende Wirkung der einzelnen Testsubstanzen auf das Plasmamembranpotential pankreatischer, primär isolierter B-Zellen analysiert. Hierfür wurde eine Variante der *patch clamp*-Technik verwendet.

3.6.1 Die *patch clamp*-Technik

Die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften elektrisch stimulierbarer Zellen wurde durch die Entwicklung der *patch clamp*-Technik wesentlich erweitert. Die Herstellung eines hochohmigen Abdichtwiderstandes (sog. „*gigaseal*“) zwischen einer feuerpolierten Glaspipette, in der sich zentral positioniert die Ableitelektrode befindet, und der Zytoplasmamembran einer intakten Zelle ermöglicht die Darstellung transmembranärer Ströme in einem Bereich weniger pA und implizit die Messungen der Leitfähigkeit einzelner Ionenkanäle (Neher und Sakmann, 1976). Das breite Anwendungsspektrum der *patch clamp*-Technik beruht nicht zuletzt darauf, dass zusätzlich zu der Messung und Charakterisierung von Einzelkanälen eines definierten Membranbereiches einer intakten Zelle („*cell attached*“) weitere Meßkonfigurationen entwickelt und etabliert wurden (Hamill et al., 1981).

Weitgehend unabhängig von dem zellulären Metabolismus können Ionenkanäle eines aus der Zytoplasmamembran isolierten Membranfragmentes („*patch*“) außerhalb des zellulären Systems („*excised patch*“) untersucht werden. In Abhängigkeit von dem Isolationsverfahren ist der *patch* entweder mit der ursprünglich internen Membranseite zu der extrazellulären Lösung orientiert („*inside out*“) oder die Außenseite der Membran ist dem extrazellulären Medium zugewandt („*outside out*“).

Die Etablierung der „*whole cell*“-Konfiguration, in der die Gesamtheit aller transmembranären Ionenkanäle einer funktionsfähigen Zelle erfasst wird, erfolgt ausgehend von dem *cell attached*-Modus durch das Anlegen einer Sogspannung (s. Abb. 3.6.1). Auf diese Weise wird die Ruptur des von der Pipettespitze umschlossenen Membranbereiches evoziert und das Zytosol der Zelle mit der Pipettenlösung elektrisch leitend verbunden. Demgemäß entspricht diese Konfiguration denjenigen Meßbedingungen, die bei elektrophysiologischen Untersuchungen mit scharfen intrazellulären Elektroden herrschen und bietet somit die Möglichkeit, die Potentialdifferenz bzw. die Leitfähigkeit der gesamten Zellmembran zu charakterisieren (Marty und Neher, 1983). Die Messung der

Potentialdifferenz, die über der gesamten Zellmembran herrscht, ist unter den Bedingungen der *cell attached*-Konfiguration nicht realisierbar.

In dem *whole cell*-Modus wird die Änderung der Potentialdifferenz bei einer konstanten Stromstärke („*current clamp*“) gemessen, wodurch die Analyse des depolarisierenden Potentials definierter Testsubstanzen durchführbar ist. Diese Technik ist bereits in einigen elektrophysiologischen Studien erfolgreich eingesetzt worden, um unter anderem die Depolarisation endokriner B-Zellen durch Inhibitoren des K_{ATP} -Kanals darzustellen (Bleck et al., 2005).

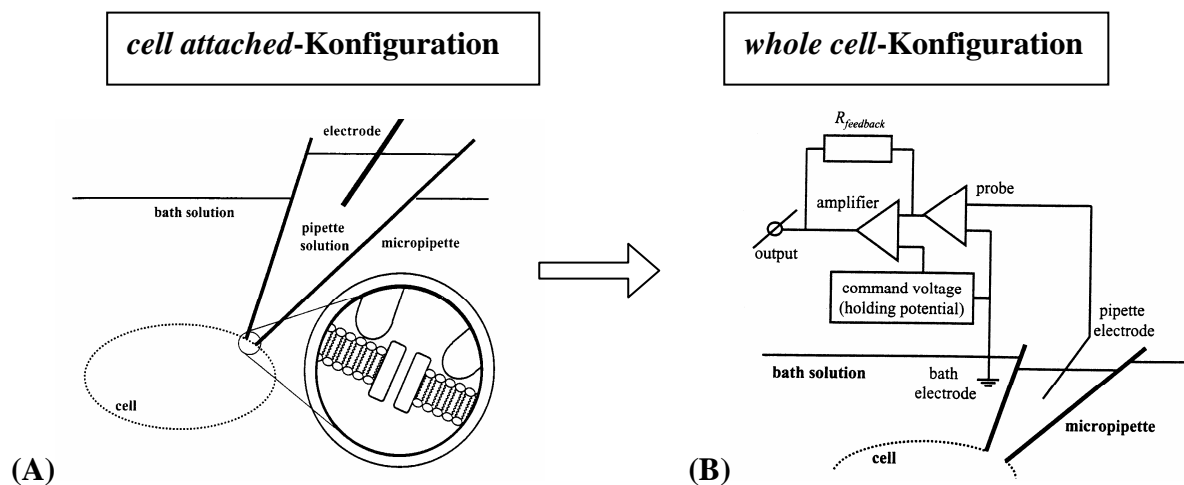


Abbildung 3.6.1 Etablierung der *whole cell*-Konfiguration ausgehend von dem *cell attached*-Modus (A) Nachdem der Kontakt zwischen der Zytoplasmamembran der fokussierten B-Zelle und der feuerpolierten Pipettenspitze hergestellt wurde, erfolgte durch das Anlegen eines leichten Unterdrucks die Sealbildung. Die erfolgreiche elektrische Isolation des von der Pipettenspitze umschlossenen Membranbereichs wurde durch einen hochohmigen Abdichtwiderstand (*gigaseal*) indiziert. (B) Ausgehend von der etablierten *cell attached*-Konfiguration wurde durch das Anlegen einer Sogspannung die Ruptur der Membran unterhalb der Pipettenspitze evoziert, so dass eine elektrisch leitende Verbindung zwischen dem Zytosol und der Pipettenlösung resultierte. (Modifiziert nach Molleman, 2003).

3.6.2 Herstellung der Patchpipette

Die Patchpipetten wurden in zwei temperaturkontrollierten Schritten aus Borosilikat-Glasröhrchen ($D_a = 2,0$, $D_i = 1,4$ mm, Fa. Hilgenberg) in einem vertikalen Pipettenziehgerät (L/M-3P-A, Fa. List-Medical-Electronic, Darmstadt) hergestellt. Zunächst wurde die Meterware unter Verwendung eines Diamantschneiders in Rohlinge mit einer einheitlichen Länge von 7,5 cm zerteilt. Diese wurden jeweils zentral innerhalb einer Heizspirale, dargestellt durch ein Platin-Iridium-Heizfilament, des vertikalen Ziehgerätes positioniert. Das Heizfilament wurde strominduziert erhitzt und die Pipetten nach der folgenden Methode hergestellt: In dem ersten Ziehschritt wurde der Glasrohling unter hoher Temperatur-

einwirkung mit einer Zuglänge von 7 mm verjüngt, wobei der Verjüngungsgrad entscheidend von dem Ausmaß der Erhitzung abhängig ist. Nach der Rezentrierung in dem Heizfilament, wurde der zweite Ziehschritt bei einer geringeren Temperatur durchgeführt, so dass durch das erneute Ausziehen mit einer Zuglänge von 12,8 mm der Glasrohling an der Position der stärksten Verjüngung in zwei Pipetten zerteilt werden konnte. Dieser zweite Ziehschritt der Pipettenherstellung beschreibt die wichtigste und empfindlichste Phase, in der sowohl die Form der Pipettenspitze als auch der Pipettedurchmesser determiniert wird. Als Auswahlkriterium für geeignete Pipetten wurde der Widerstand der in der extrazellulären Lösung eingetauchten Pipetten gemessen, der sich innerhalb einer Größenordnung von fünf bis sieben Megaohm befinden musste.

Für die Herstellung eines hochohmigen Abdichtwiderstandes, einem so genannten „*gigaseal*“, ist die Hitzepolierung der Pipettenspitzen erforderlich, die unter Mikroskopkontrolle an einem stromdurchflossenen ($I = 2,12 \text{ A}$) Platin-Iridium-Heizfilament (Fa. Degussa) durchgeführt wurde. Die Pipettenspitze wurde über einen Zeitraum von 15 Sekunden in einem Abstand von 10 bis 20 μm vor dem glasbeschichteten Draht positioniert, der sich in einer für die Beschichtung und Polierung von Patchpipetten entwickelten Microforge (CPM-2, *coating/polishing microforge*, Scientific Instruments, New York) befand. Die resultierenden Pipetten wurden zum Schutz vor Beschädigungen und Kontaminationen in einem Behältnis aufbewahrt und bis zu sechs Stunden nach der Herstellung für die elektrophysiologischen Messungen verwendet.

3.6.3 Elektroden der patch clamp-Messungen

Als Ableitelektrode diente ein chlorierter Silberdraht, der zentral in der mit Elektrolyt gefüllten Patchpipette eingespannt wurde. Die in dem extrazellulären Medium positionierte Referenzelektrode wurde ebenfalls durch einen chlorierten Silberdraht dargestellt. Bedingt durch den reversiblen Stromfluss durch die Silberchlorid-Beschichtung, führen Änderungen der extrazellulären Chlorid-Konzentration zu der Entstehung geringer Offsetpotentiale. Um die Manifestation derartiger Übergangspotentiale zu reduzieren und um die Diffusion von Chloridionen in das extrazelluläre Medium zu verhindern, wurde die Referenzelektrode über eine Agarbrücke (3 M KCl, 4 % Agar) mit der Badlösung leitend verbunden. Zudem wurde durch die Isolation der Referenzelektrode die Akkumulation einer zelltoxischen Chlorid-Konzentration innerhalb der extrazellulären Lösung verhindert.

Die Chlorierung der gereinigten Silberdrähte erfolgte durch Elektrolyse der in einer Chlorid-haltigen Lösung (1 M KCl) eingetauchten und an der Anode bzw. Platin-Iridium-Kathode einer Batterie angeschlossenen Drähte. Während der Elektrolyse reagieren die

Chloridionen mit dem elementaren Silber unter Elektronenabgabe zu Silberchlorid, das sich auf dem oxidierten Silberdraht abscheidet. Auf diese Weise resultiert eine gleichmäßige Chlorierung der Elektrode, wobei die Anwesenheit von Silberkationen und Chloridionen einen reversiblen Stromfluss gewährleisten. Die Elektroden wurden regelmäßig in einem Abstand von vier Wochen einer erneuten Chlorierung unterzogen.

3.6.4 Herstellung der Agarbrücke

Wie bereits erwähnt wurde die Referenzelektrode über eine Agarbrücke mit der extrazellulären Lösung elektrisch leitend verbunden, so dass in unmittelbarer Umgebung der Elektrode eine konstante Chlorid-Konzentration herrschte. Die Herstellung der Brücke erfolgte durch die luftblasenfreie Befüllung einer weitleumigen Glaskapillare mit 50 ml einer 3 M Kaliumchlorid-Lösung, die unter Hitzeeinwirkung mit 4 % Agar substituiert wurde. Die resultierende Agarbrücke wurde innerhalb einer 150 mM Kaliumchlorid-Lösung aufbewahrt und bei einer Temperatur von 2 bis 8 °C gelagert.

3.6.5 Die Versuchsanordnung der patch clamp-Messungen

Die *patch clamp*-Messungen erfordern aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit eine effiziente Abschirmung der Messvorrichtung von exogenen Wechselspannungsquellen, die durch die Erzeugung von magnetischen und elektrischen Wechselfeldern ein permanentes Hintergrundrauschen verursachen. Um ein günstiges Signal-Rausch-Verhältnis einzustellen, welches Signalaufösungen in Bereichen weniger pA zulässt, wurde der Messplatz durch einen Faraday-Käfig elektrisch von der Umgebung isoliert. Beeinträchtigungen der Signalqualität durch mechanische Schwingungen wurden durch die Positionierung des inversen Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss), der Pipettenhalterung mit dem Vorverstärker (EPC-7, HEKA Elektronik) und des hydraulischen Mikromanipulators (Model MO-113, Narishige Japan, Tokyo) auf einem druckluftgedämpften Tisch (LT-100/80-A4SISA, Barry Controls) ausgeschlossen. Rauschsignale hoher Frequenz (100 kHz), deren Ursprung in der Regel auf die Zellmembran, die Patchpipette und den Vorverstärker zurückzuführen ist, wurden durch die Integration eines aktiven Tiefpassfilters (AF 173, Thomatronik, Rosenheim, Germany) mit vierpoliger Besselcharakteristik in den Schaltkreis minimiert.

Die Registrierung und Speicherung der analog-digitalisierten (Digital-Data-Recorder VR-10B, Instrutech Corporation, New York, USA) Messdaten erfolgte parallel auf Videobändern und unter Verwendung eines Schnellschreibers (TA240 Easygraf, Model 42-8240-10, gold Instrument System) mit eingefügtem AC/DC-RMS-Verstärker (Modell 13-6615-20) auf Thermopapier (Gould Teilenummer CL-213688, Gould-Nicolet). Die

quantitative Analyse der für die Fragestellung relevanten Messabschnitte erfolgte computergesteuert in dem Programm Clampfit der Software Pclamp 6.03 (Axon Instruments, Inc, USA). Die Digitalisierung der analogen Signale beruhte auf einer Interface-Card (TL-1 DMA Interface, Axon Instruments). Die für die graphische Darstellung erforderliche Bearbeitung der Versuchsergebnisse wurde in dem Programm GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt.

3.6.6 Sealherstellung und Etablierung der whole cell-Konfiguration

Die kultivierten B-Zellen wurden zunächst durch die wiederholte Spülung mit der filtrierten (Filtropur S plus 0,2, Fa. Sarstedt) Extrazellulärlösung von den Komponenten des RPMI 1640-Kultivierungsmediums gereinigt. Als Messkammer diente die Petrischale (Außendurchmesser 35 mm, Fa. Sarstedt) selbst, die innerhalb einer genau angepassten Ausfräsung des Objektisches oberhalb der Objektive positioniert wurde. Ein konischer Plexiglaseinsatz mit entsprechenden Aussparungen für den Zulauf und den Ablauf des langsamen Perifusionssystems sowie für die Agarbrücke mit der Referenzelektrode wurde unter Volumenverringerung direkt in die Petrischale eingefügt.

Die kontinuierliche Umströmung der kultivierten B-Zellen mit dem Extrazellulärmedium wurde durch die Einwirkung von Gravitationskräften auf die oberhalb des Badniveaus platzierten Bechergläser, welche die entsprechenden Testmedien enthielten, gewährleistet. Der Ablauf der Badlösung erfolgte durch die Saugkraft einer nachgeschalteten Wasserstrahlpumpe, die zur Vermeidung von Rückflüssen des Mediums über Polyethylenschläuche mit einer Vakuumflasche verbunden wurde. Die Zulaufgeschwindigkeit zu dem Bad und der Medienwechsel wurden über einen Vierwegehahn (Stämpfli-Hahn) geregelt. Zwischengeschaltete Glastropfkammern dienten in diesem Zusammenhang der elektrischen Isolierung des Systems von den Flüssigkeitssäulen der Testlösungen, die sich in den Zuleitungen bildeten. Als Zeitpunkt des Medienwechsels wurde der Zulauf des ersten Tropfens in die Badlösung festgelegt.

Die Patchpipette wurde luftblasenfrei mit der filtrierten (Filtropur S plus, Sarstedt) Pipettenlösung, die unter den Bedingungen der *whole cell*-Konfiguration gleichzeitig das intrazelluläre Medium repräsentiert, befüllt und in die Pipettenhalterung des Vorverstärkers (EPC-7, HEKA Elektronik) eingesetzt. Die Ableitelektrode befand sich zentral innerhalb der Kapillare positioniert und stand dementsprechend in direktem Kontakt mit der Pipettenlösung. Um zu verhindern, dass sich während des Eintauchens der Patchpipette in die extrazelluläre Lösung Partikel und Verunreinigungen zwischen der Membran und der Pipettenspitze ansammelten, herrschte in dieser Phase ein leichter Überdruck in der Messpipette.

Die Patchpipette wurde mit Hilfe eines hydraulischen Mikromanipulators (Model MO-103, Narishige Japan, Tokio) unter Mikroskopkontrolle (Axiovert 135, Zeiss) in der 40fachen Vergrößerung (Achromplan 40x/0,60, Zeiss) an die Membran der fokussierten Zelle herangeführt. Vor der Etablierung des *seals* erfolgte die Kompensation der Elektrodenpotentiale sowie der an den Grenzflächen der Lösungen herrschenden „*liquid junction*“-Potentiale. Daraufhin wurde unter Aktivierung des *voltage-clamp*-Modus ein leichter Unterdruck an die Pipette angelegt, so dass durch die Sogwirkung die Membran der anvisierten Zelle in den Mündungsbereich der Pipettenspitze eingesaugt wurde. Die erfolgreiche Herstellung eines hochohmigen *seals* wurde durch die deutliche Reduktion der Test-Puls-Amplitude und die massive Steigerung des ursprünglichen Pipettenwiderstandes in den Bereich einiger $G\Omega$ indiziert.

Unter den Bedingungen der *cell attached*-Konfiguration (s. Abb. 3.6.1 (A)) entspricht die Potentialdifferenz der Membran dem Ruhemembranpotential der endokrinen B-Zelle, das durch das K^+ -Gleichgewichtspotential und die Leitfähigkeit des einwärts gleichrichtenden K_{ATP} -Kanals auf einen Wert von -60 bis -70 mV determiniert wird (Ashcroft und Rorsman, 1989).

Vor der Ruptur der Membran wurde nach der Kompensation der Pipettenkapazität (C_{fast}) die Signalverstärkung von 20 mV/pA auf einen Wert von 2 mV/pA reduziert, die Frequenz der mit einer vierpoligen Besselcharakteristik tiefpass gefilterten Signale erhöht (*low pass*-Potentiometer: Faktor 10, Multiplier: 10 kHz) und die Haltespannung auf -70 mV eingestellt, die somit dem unter Ruhebedingungen vorliegenden Membranpotential entsprach. Durch das Anlegen eines Unterdruckes an die Pipette wurde infolge der forcierten Membranruptur eine leitende Verbindung zwischen der Ableitelektrode und dem Zytosol der Zelle hergestellt (s. Abb. 3.6.1 (B)). Als Konsequenz der freigesetzten Membranfragmente sowie der in dem Zytoplasma vorliegenden Komponenten wurde die Öffnungsweite der Pipettenmündung und implizit die Leitfähigkeit zwischen der Elektrode und dem Zytoplasma reduziert. Der resultierende Widerstand wird als Serienwiderstand R_{series} definiert und weist in der Regel einen zweifach höheren Wert als der Pipettenwiderstand auf.

Vor der Messung des Membranpotentials der perfundierten B-Zellen wurde die Kompensation des Serienwiderstandes und der Zellkapazität durch den Abgleich von G_{series} und C_{slow} aktiviert. Daraufhin wurde der *voltage clamp*-Modus in den *current-clamp*-Modus umgeschaltet, so dass bei einer konstanten Stromstärke Änderungen des Membranpotentials analysiert werden konnten. Da unter *current clamp*-Bedingungen die EPC-7-gesteuerte Kompensation des Serienwiderstandes sowie der Abgleich der kapazitiven Ströme C_{fast} und

C_{slow} außer Kraft gesetzt werden, ist eine präzise Einstellung der Messbedingungen in dem *voltage-clamp*-Modus entscheidend für die Genauigkeit der elektrophysiologischen Messungen.

3.6.7 Auswertung der Messergebnisse

Für die Fragestellung relevante Versuchsabschnitte wurden als einzelne Episoden, die einen Zeitraum von zehn Sekunden umfassten, von dem Videoband eingelese und als separate *files* auf der Festplatte der Prozessors gespeichert. Die quantitative Analyse der digitalisierten Signale erfolgte unter Anwendung des Programms Clampfit: der horizontal angeordnete Cursor wurde in den mittleren Bereich der Registrierung positioniert, so dass der entsprechende Wert der Potentialdifferenz direkt abgelesen werden konnte. In den Bereichen von Aktionspotentialen wurde sowohl ein Plateauwert als auch ein Spitzenwert registriert, deren jeweiliger Betrag nach dem beschriebenen Prinzip aufgerufen und quantitativ ausgewertet werden konnte. Für Episoden mit einem konstanten Signalniveau wurden mit Hilfe des Computerprogramms die entsprechenden Mittelwerte der Potentialdifferenz berechnet werden.

3.7 Computergestützte Simulation der Molekülgeometrie

Für die Aufstellung einer aussagefähigen Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen dem hypoglykämischen Potential und den stereochemischen Eigenschaften ausgewählter Fluorchinolone wurde versucht, ein Korrelat zwischen der Molekülgeometrie und dem Ausmaß der Fluorchinolon-induzierten Effekte gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der elektrischen Aktivität endokriner B-Zellen herzustellen. Berücksichtigung fanden ebenfalls die im Rahmen dynamischer Messungen der Insulinsekretionsrate für einige Fluorchinolone analysierten insulinotropen Eigenschaften (Pflöger, 2006). Diese Perifusionsmessungen wurden zeitgleich zu den vorgestellten Untersuchungen in einer weiteren Arbeitsgruppe des Institutes durchgeführt.

Die systematische Variation des Substitutionsprofils in der C7- und der N1-Position erlaubte bei den Modellstrukturen C1 bis C4 die Beurteilung eines Zusammenhanges zwischen der Molekülkonstitution und der Effizienz der analysierten Effekte gegenüber den pankreatischen B-Zellen. Bei den therapeutisch verfügbaren Substanzen wurden Fluorchinolone eingesetzt, die nachweislich mit Störungen der Glucose-Homöostase assoziiert waren und als Inhibitoren des K_{ATP} -Kanals identifiziert wurden (Lomefloxacin, Gatifloxacin). Diese wurden mit Strukturanaloga verglichen, die bisher nicht oder nur in seltenen Fällen mit Hyper- bzw. Hypoglykämien in einem Zusammenhang standen

(Norfloxacin, Moxifloxacin). Unter diesem Aspekt wurden Pendants aus den Struktur-Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin sowie Gatifloxacin und Moxifloxacin bzw. Ciprofloxacin gebildet und hinsichtlich ihrer Molekülgeometrie und räumlichen Ausdehnung bzw. Stereochemie zueinander in Relation gesetzt. Zusätzlich wurden Berechnungen des elektrostatischen Potentials der jeweiligen Derivate in die Untersuchungen einbezogen.

Die Berechnung und visuelle Darstellung der Molekülgeometrie erfolgte unter Anwendung des *molecular modelling*-Programms HyperChem (*HyperChem release 7.5*, Hypercupe Inc., Gainesville, Florida) in Kombination mit dem Konformationsmodul HyperSpin (*HyperSpin version 3.1.7*, von Marcio Cyrillo, Mai 1999). Dieses etablierte Computerprogramm implementiert quantenmechanische Methoden (als semiempirische Verfahren AM1, PM3, etc.) und Kraftfeldverfahren (*Molecular Mechanics* MM+, Amber, etc.), so dass zahlreiche kombinationsfähige Optionen zur Verfügung stehen, welche die Berechnung und Konstruktion einer weitgehend realistischen Molekülgeometrie gestatten. Eine wichtige Voraussetzung ist die richtige Parametrisierung des jeweils gewählten Berechnungsverfahrens.

Die detaillierte Charakterisierung der geometrischen und elektronischen Eigenschaften der Fluorchinolone umfasste die Berechnung der Molekülgeometrie, des elektrostatischen Potentials und die Analyse des Konformationsraumes des rotationsfähigen Substituenten in der Position C7. Alle Simulationen und semiempirischen Berechnungen beziehen sich auf die Gasphase, so dass Lösungsmittelleffekte oder intermolekulare Wechselwirkungen unberücksichtigt blieben. Die genaue Vorgehensweise und Auswertung der Ergebnisse werden exemplarisch für die Fluorchinolone C3 und C4 vorgestellt.

3.7.1 Verfahren des *Molecular Modelling*

Die Basis der computergestützten Berechnung, Visualisierung und Manipulation von organischen und anorganischen Molekülen wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts mit der Entwicklung quantenmechanischer Modelle und dem Verständnis der Moleküldynamik gelegt. „*Molecular Modelling*“ („MM“) und das spezieller ausgerichtete Verfahren des „*Computer Aided Molecular Design*“ („CAMD“) sind definiert als computergestütztes Modellieren von Molekülen, um deren Struktur bzw. Konformationen und elektrostatischen Verhältnisse in dem dreidimensionalen Raum zu simulieren. Mit den etablierten CAMD-Verfahren sind darüber hinaus moleküldynamische Prozesse, Molekülkonformationen sowie die spektroskopischen, kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der untersuchten Verbindungen charakterisierbar.

Die Berechnung der Moleküleigenschaften beruhen entweder auf den Modellvorstellungen der Quantenchemie (AM1, PM3) oder alternativ den Kraftfeldmethoden der Molekülmechanik (MM2, MM3, etc.). Bei den quantenmechanischen Verfahren wird zwischen den nicht-empirischen *ab initio*-Methoden, deren Bezeichnung auf die zeitintensiven Berechnungsgrundlagen hindeutet, und den durch die Einführung von Näherungen simplifizierten semiempirischen Berechnungsverfahren differenziert, zu denen unter anderem die parametrische Methode 3 (PM3) gehört. Die von den Grundlagen der Molekülmechanik abgeleiteten Methoden und die quantenmechanischen Verfahren werden in den folgenden Kapiteln explizit vorgestellt.

Die Validitätsprüfung sowie die Verifizierung der berechneten Ergebnisse basiert auf dem Vergleich mit bekannten Standardwerten, die über spezielle Reaktionsdatenbanken (SYNLIB, REACCS, CHIRON, ORAC, etc.) und Fragmentbibliotheken zugänglich sind, sowie mit den Resultaten aus Röntgenstrukturanalysen (*Cambridge Crystallographic Data Centre*), Raman- und IR-spektroskopischen Registrierungen.

3.7.1.1 Kraftfeldmethoden

Die Molekülsimulation auf der Grundlagen der Kraftfeldmethoden („*force field*“) beruhen auf den Vorstellungen der klassischen Newtonschen Mechanik und Elektrostatik, welche die Atome des Moleküls als Massepunkte auffassen. Diese stehen über ein Bindungsnetzwerk unterschiedlicher Reichweite miteinander in Kontakt, wobei die Bindungen selbst im einfachsten Fall als harmonisch schwingende Federn mit einer definierten Kraftkonstante interpretiert werden. Für die Berechnung der Gesamtenergie des Moleküls werden die unterschiedlichen Kräfte, welche auf die einzelnen Atome einwirken, als klassische Potentiale beschrieben. Die Berechnung der quadratischen Potentialfunktion für die Bindungslänge, den Bindungswinkel, den Torsions- bzw. Diederwinkel und die nicht-kovalenten Interaktionen, *i.e.* Van-der-Waals-Wechselwirkungen (Lennard-Jones-Potential), elektrostatische Wechselwirkungen (Coulomb-Potential) und Wasserstoff-Brückenbindungen (Buckingham-Potentiale) ermöglicht die Determinierung der Molekülenergie:

$$E_{\text{gesamt}} = E_{\text{B.-Länge}} + E_{\text{B.-Winkel}} + E_{\text{Torsionswinkel}} + E_{\text{nicht-kovalent}}$$

Die einzelnen Energiebeträge werden für jedes Atom des Systems kalkuliert, wobei deren Positionswechsel eine Veränderung der Potentialenergie des Moleküls verursacht.

Um die divergente chemische Umgebung der einzelnen Atome zu berücksichtigen, enthalten die Potentialfunktionen für jede Atomart spezifische Parameter, die empirisch an

experimentelle Daten (thermodynamische Messungen, Kristallstrukturanalysen, etc.) und quantenmechanische Berechnungen angepasst werden. Als Beispiel ist der variable Hybridisierungsgrad der Kohlenstoffatome der analysierten Fluorchinolone anzuführen: sp^3 -C-Atome und sp^2 -C-Atome werden von der Kraftfeldmethode MM2 identifiziert und als unterschiedliche Atomarten behandelt, denen implizit ein spezifischer Satz aus Parametern zugeordnet wird.

Ein wesentlicher Nachteil der Kraftfeldmethoden ist die Reduktion der Atomkerne auf Massepunkte, so dass die Elektronen der Atome nicht explizit erfasst und die Elektronbewegungen des Moleküls vernachlässigt werden. Als Konsequenz sind elektrostatische Potentiale, Ionisierungsenergien, delokalisierte Systeme sowie andere physikochemische Eigenschaften, welche die Berücksichtigung der Elektronen erfordern, nicht mit den Kraftfeld-Methoden charakterisierbar. Die Kraftfeldmethoden werden jedoch aufgrund des geringen Rechenaufwandes und der unkomplizierten Durchführung für die Simulation bzw. Berechnung der Molekülgeometrie und der relativen Potentialenergie sowie die Geometrieoptimierung bevorzugt eingesetzt

Die konventionellen Kraftfeld-Modelle („*Molecular Mechanics*“ MM2, MM3, AMBER, etc.) unterscheiden sich hinsichtlich der Parameterwahl, wobei die zu Grunde liegende Parametersammlung auf der Anpassung der berechneten Werte an experimentell ermittelte Daten einzelner Testmoleküle oder Molekülfragmente zurückzuführen ist. Um eine hohe Genauigkeit der Ergebnisse, die mit realistischen Modellen konform sind, gewährleisten zu können, sollten das simulierte Molekül und das Testmolekül, auf dem die Parametrisierung basiert, der gleichen Verbindungsklasse angehören.

3.7.1.2 Quantenmechanische Verfahren

Im Gegensatz zu der Molekülmechanik basieren die quantenmechanischen Berechnungsmethoden auf der zeitunabhängigen Schrödinger-Gleichung, die unter Anwendung der Born-Oppenheimer-Näherung gelöst wird. Diese Approximate hebt das Korrelat zwischen den Atomkernen und den Elektronen auf, indem es Moleküle als eine Ansammlung von Elektronen interpretiert: die Bewegungen der Atomkerne erfolgt aufgrund ihrer wesentlich schwereren Masse deutlich langsamer als die Bewegungen der Elektronen. Dementsprechend können die Elektronenbewegungen getrennt von den Kernbewegungen behandelt werden, so dass für die Berechnung der Molekülgeometrie und der elektronischen Struktur des Moleküls die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen innerhalb der Orbitale relevant ist. Diese wird durch das Lösen der Schrödinger-Gleichung bzw. der Elektronenwellenfunktionen erfasst, wobei nach der De-Broglie-Beziehung die Wellenlänge

durch die kinetische Energie des Teilchens ersetzt werden kann. Die Gesamtenergie des Systems resultiert aus der Summe der einzelnen Energiebeiträge:

$$E_{\text{gesamt}} = E_{\text{kin, Kern}} + E_{\text{Elektron}} + E_{\text{pot.,Kern-Kern}} + E_{\text{pot.,Elektron-Kern}} + E_{\text{pot.,Elektron-Elektron}}$$

Basierend auf der Born-Oppenheimer-Näherung wird die kinetische Energie der Atomkerne $E_{\text{kin, Kern}}$ gleich Null gesetzt und die Abstoßung zwischen den Kernen $E_{\text{pot.,Kern-Kern}}$ als konstante Größe betrachtet. Eine exakte Lösung der Schrödinger-Gleichung existiert jedoch nur für das Wasserstoffatom bzw. Einelektronensysteme, so dass die Elektronenwellenfunktion für Moleküle aus den bekannten Lösungen der Einelektronensysteme zusammengesetzt wird. Die Beiträge dieser Einelektronenwellenfunktionen werden durch Variationen so verändert, dass der Energiebetrag der Gesamtwellenfunktion einem Minimum zustrebt. Dies entspricht dem Prinzip des „*Self Consistent Field*“ (SCF)-Verfahrens.

Um die Wellenfunktion für jedes Elektron in dem Molekül zu berechnen, haben sich semiempirische Verfahren sowie *ab initio*-Berechnungen etabliert. Im Gegensatz zu den rechenintensiven *ab initio*-Verfahren, ermöglichen semiempirische Berechnungen durch die Einführung von Näherungen innerhalb eines kurzen Zeitraumes die Simulation realistischer Molekülgeometrien. Eine wesentliche Vereinfachung besteht darin, dass lediglich die Valenzelektronen betrachtet werden, während die Elektronen der inneren Molekülorbitale mit dem Atomkern als „*core*“ („*frozen core*“-Näherung) zusammengefasst werden. Ebenso werden Wechselwirkungen zwischen Elektronen in den überlappenden Atomorbitalen vollständig ignoriert („*Complete Neglect of Differential Overlap*“, CNDO) oder nur zwischen zwei Atomen berücksichtigt - definiert als „*Modified Neglect of Diatomic Overlap*“ (MNDO, Dewar und Thiel, 1977). Bei der für die Charakterisierung der stereochemischen Fluorchinolon-Eigenschaften gewählten „Parametrischen Methode 3“ (PM3, Stewart, 1989) handelt es sich um die Weiterentwicklung einer solchen MNDO-Näherung.

3.7.2 Berechnung der Molekülgeometrie

Die Simulation der Molekülgeometrie und nachträgliche Optimierung erfolgte mit der semiempirischen Methode PM3. Es handelt sich um die Weiterentwicklung des „Austin Modells 1“ (AM1, Dewar et al., 1985), das durch die Berechnung der Schrödinger-Gleichung - auf der Grundlage der Born-Oppenheimer-Approximate und der Hartree-Fock-Näherung - die Simulation von Molekülgeometrien ermöglicht. Die Besonderheiten der Parametrischen Methode 3, im Vergleich zu anderen semiempirischen Verfahren, sind die Berücksichtigung einer höheren Anzahl an Freiheitsgraden bei der automatischen Parametrisierung, die

Reproduzierbarkeit von Wasserstoff-Brückenbindungen sowie die verbesserte geometrische Darstellung von Stickstoff-, Schwefel- und Nitroverbindungen, so dass die Geometrien ungewöhnlicher Strukturen berechnet werden können.

Die einzelnen Molekülstrukturen wurden in der ersten Phase der Simulation mit Hilfe eines implementierten Graphik-Programms gezeichnet und unter Verwendung von Standardwerten für Bindungslängen und -winkel näherungsweise optimiert. Als Darstellungsoption wurde der Modus „ball und cylinders“ gewählt. Die Präzision der Molekülgeometrie erfolgte in der zweiten Phase auf der Grundlage der Schrödinger-Gleichung, die mit Hilfe des semiempirischen Verfahrens PM3 gelöst wurde. Die Berechnung umfasste Einzelpunktkalkulationen nach dem „Self Consistent Field“ (SCF)-Verfahren. Diese Methode des selbstkonsistenten Feldes beruht auf dem bereits erwähnten Variationsprinzip, so dass durch die Veränderung der Atomposition in dem System immer neue Einzelpunktkalkulationen (SCF-Zyklen) durchgeführt wurden. Dieser Prozess wurde solange wiederholt, bis die Ergebnisse der Elektronenwellenfunktion Konvergenz erreichten und sich die Lösung der Schrödinger-Gleichung für das Systems nicht mehr wesentlich änderte.

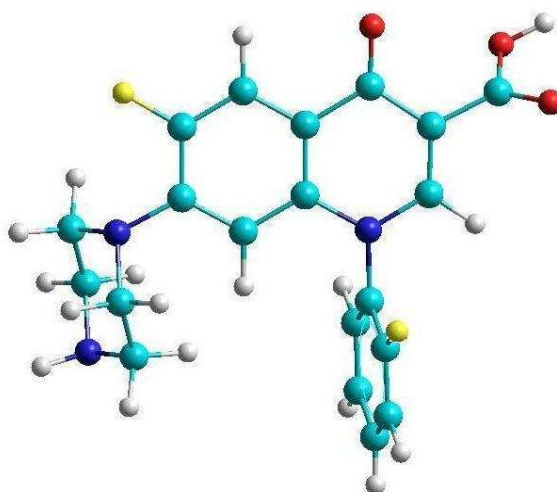


Abbildung 3.7.2 Optimierte Molekülstruktur des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C4 Die Berechnung und Optimierung der Molekülgeometrie des Fluorchinolons C4 erfolgte durch die Lösung der Schrödinger-Gleichung, die mit der semiempirischen Methode PM3 durchgeführt wurde. Es handelt sich um ein quantenmechanisches Verfahren, das auf dem Prinzip der „Self Consistent Field“ (SCF)-Kalkulation beruht. In erster Näherung wird ein Modell des Molekülorbitals (LCAO-MO) berechnet, das sich aus linear kombinierten Atomorbitalen (LCAO) zusammensetzt. Die nachfolgende Iteration von Gleichungen wurde solange durchgeführt, bis Konvergenz vorlag. In diesem Stadium führte die Lösung der Schrödinger-Gleichung nicht mehr zu merklichen Änderungen. Nach diesem Prozess wird auf der etablierten Energiehyperfläche nach lokalen Energieminima gesucht.

Auf diese Weise wurde die Topologie der Energiehyperfläche systematisch nach einem Minimum durchsucht, so dass die Lösung die geometrischen Koordinaten derjenigen Molekülkonfiguration enthielt, die einem lokalen Minimum der Gesamtenergie entsprach. Als Suchmethode für die lokalen Energieminima wurde die „*Conjugated Gradient-Methode*“ in der Variante von Polak und Ribiere gewählt: eine optimierte Molekülgeometrie lag vor, wenn für die Energiegradienten Werte $< 0,1 \text{ kcal}/(\text{\AA} \text{ mol})$ kalkuliert wurden.

3.7.3 Konformationssuche („*conformational search*“)

Die Untersuchung des Konformationsraumes („*conformational search*“) dient der Auffindung der energieärmsten Molekülkonformation, welche das System aufgrund der hohen thermodynamischen Stabilität mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einnehmen wird. Jede mögliche Molekülgeometrie wird innerhalb eines n-dimensionalen Koordinatensystems durch n-Koordinaten beschrieben, denen ein definierter Energiewert zugeordnet ist. Die in dem gewählten System aufgespannte Fläche wird als Energiehyperfläche bezeichnet, die den gesamten Konformationsraum des Moleküls repräsentiert. Topologisch ist die Hyperfläche durch lokale bzw. globale Minima (stabile Molekülgeometrie) und Maxima (instabile Molekülgeometrie) sowie durch Sattelpunkte als Übergangszustände charakterisiert.

Die Durchsuchung des Konformationsraumes mit dem gewählten Rechenverfahren unter dem angegebenen Algorithmus und Abbruchkriterium ermöglicht die Findung einer energieoptimierten Konformation, wobei es sich jedoch nicht zwangsläufig um das globale Minimum handeln muss. Die Konformationsanalyse wurde für die Rotation des C7-Substituenten um die N1'-C7-Bindung mit dem Programm HyperSpin (*HyperSpin, version 3.1.7* von Marcio Cyrillo, Mai 1999), einem Konformationsmodul der Software HyperChem, durchgeführt. Die freie Energie der Konformere wurde sequentiell in 10° Inkrementen analysiert und das resultierende Energieprofil zweidimensional dargestellt.

Die räumliche Orientierung des C7-Substituenten zu dem bicyklischen Grundgerüst übt keinen direkten Einfluss auf die Planarität des Molekülsystems aus, determiniert jedoch wesentlich die sterische Ausdehnung in dem dreidimensionalen Raum. Der Torsionswinkel, der sich mit dem Diederwinkel zu 180° ergänzt, ist als dihedraler Winkel aufzufassen, der das Maß für die Rotation um die Bindungsachse zwischen zwei Kernen definiert. In Bezug auf die bicyklischen Fluorchinolone wird der Torsionswinkel zwischen der Ebene, die von der C2'-N1'-C7-Sequenz aufgespannt wird, und der Ebene des Fluorchinolon-Grundgerüsts - entsprechend der C8-C7-N1'-Sequenz - etabliert. Die Rotation in einem flexiblen System ist mit einer Energieänderung (Totalenergie) verbunden, so dass die Konformere durch divergente thermodynamische Eigenschaften charakterisiert sind (s. Abb. 3.7.3). Die Ursachen

für die Energiebarrieren ist komplexer Natur und unter anderem das Resultat von Wechselwirkungen zwischen den Kernen sowie den freien Elektronenpaaren.

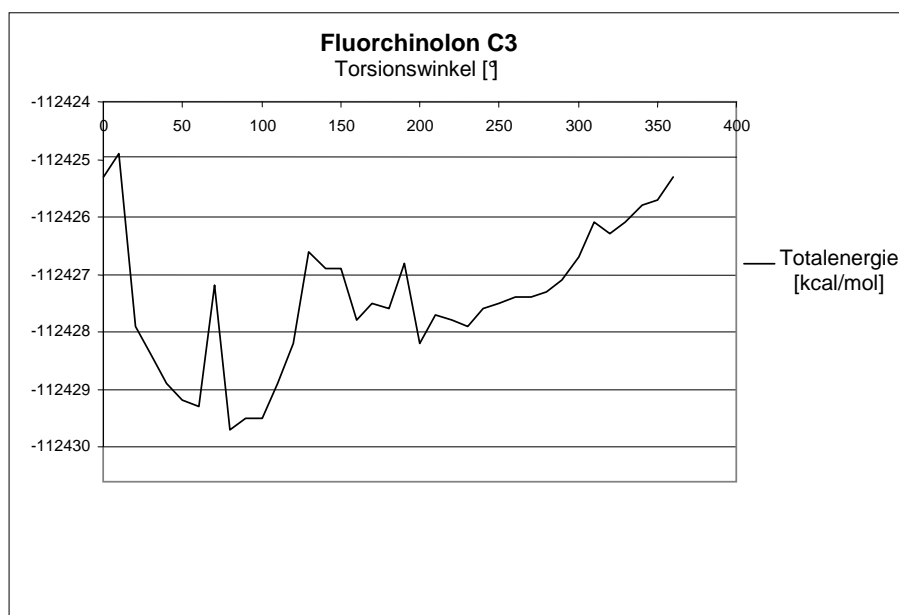


Abbildung 3.7.3 Optimierte Molekülstruktur des p-Fluorphenyl-Fluorchinolons C3 Die Konformationsanalyse des Fluorchinolons C3 basierte auf der Berechnung der relativen Energie (Totalenergie) einzelner Konformere, die durch die freie Rotation des C7-Substituenten um die C7-N1'-Bindungsachse ineinander überführt werden können. Der Konformationsraum wurde in 10°-Inkrementen von 0° bis 360° nach demjenigen Konformer durchsucht, dessen Geometriekoordinaten einem Minimum der Gesamtenergie entsprachen. Das thermodynamisch stabilste Konformer des Fluorchinolons C3 lag bei einem Rotationswinkel von 80° um die C7-N1'-Bindung vor. Demzufolge ist von einer nahezu antiplanaren Orientierung auszugehen, bei der sich die von dem C7-Substituenten aufgespannte Ebene vertikal zu der Ebene des 4-Chinolon-Grundgerüsts orientiert. Aufgrund der geringen Deformationen der Bindungsverhältnisse und der minimalen Ringspannung ist dieses Konformer mit der höchsten Wahrscheinlichkeit präsent.

3.7.4 Berechnung des elektrostatischen Potentials

Das molekulare elektrostatische Potential (MEP) einer Verbindung an einem definierten Ort relativ zu einer positiven Probeladung wird durch die Elektronendichteverteilung und die Kernladungen determiniert. Die Dichteverteilung der Elektronen entspricht dabei der relativen Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen in den Atomorbitalen, die durch lineare Kombination des Molekülorbital konstituieren. Aus diesem Grund ist die Abhängigkeit der Elektronenverteilung von der Molekülgeometrie und der Entfernung der Atome zueinander von besonderer Bedeutung.

Die computergestützte Berechnung des elektrostatischen Potentials und der assoziierten geometrischen Abbildung auf der Moleküloberfläche ist aufgrund der expliziten Betrachtung der Elektronen nur über quantenmechanische Verfahren zugänglich. Für die Lösung der Schrödinger-Gleichung bzw. der entsprechenden Elektronenwellenfunktionen der

linear kombinierten Atomorbitale wurde die bereits erwähnte semiempirische Methode PM3 angewendet, welche die Berechnung elektronischer Strukturen ermöglicht.

Das Ausmaß der elektrostatischen Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte gegenüber einer positiven Referenzladung wird durch die Berechnung der elektrostatischen Kraftkonstanten auf der Van-der-Waals-Oberfläche des Moleküls determiniert. Die Van-der-Waals-Oberfläche (CPK-Modell) wird dabei durch die Darstellung des Moleküls als nicht-deformierbare Kugel mit dem experimentell ermittelten Van-der-Waals-Radius konstruiert. Jeder Wert der berechneten skalaren Größen wird auf der definierten Oberfläche farblich kodiert abgebildet, so dass die Ladungsdichteverteilung bzw. das elektrostatische Potential auf der gesamten Moleküloberfläche dargestellt wird. Bereiche gleicher Färbung repräsentieren Flächen identischer Elektronendichte (isoelektrische Flächen). Positive Werte des molekularen elektrischen Potentials kennzeichnen eine elektrostatische Abstoßung (grün dargestellt) der positiven Referenzladung, während negative Werte eine anziehende Wirkung (violett dargestellt) zum Ausdruck bringen.

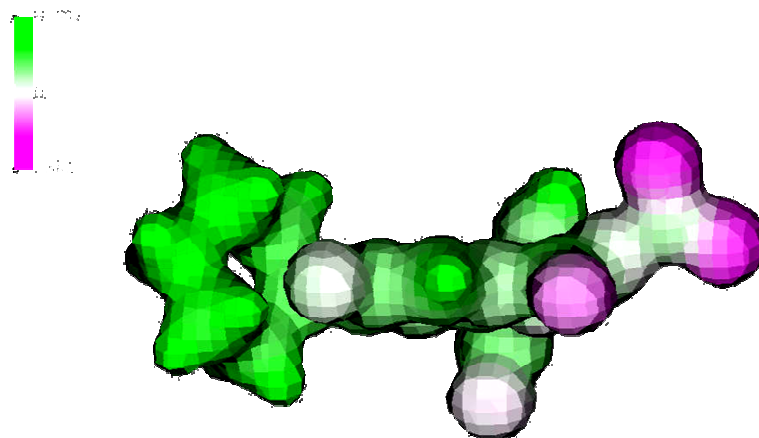


Abbildung 3.7.4 Molekulares elektrostatisches Potential (MEP) des Fluorchinolons C4 Das mit dem semiempirischen Verfahren PM3 berechnete elektrostatische Potential wurde als isoelektrische Fläche, so genannte „3D-mapped-isosurface“, auf der Ladungsdichte der Moleküloberfläche abgebildet. Bereiche gleicher Farbkodierung entsprechen Flächen mit identischer Ladungsdichte res. Elektronendichte, wobei elektrochemisch neutrale Molekülbereiche durch ungefärbte Flächen dargestellt werden. In Relation zu einer positiven Referenzladung, die sich auf der Van-der-Waals-Oberfläche des Moleküls bewegt, wird das Ausmaß der Abstoßungskräfte durch positive Werte determiniert und durch variierende Grünnuancen repräsentiert. Elektrostatische Anziehungskräfte werden dementsprechend durch negative Werte indiziert, denen variierende Violettnuancen zugeordnet sind.

4. Ergebnisse

Um die potentielle Stimulation endokriner B-Zellen während einer Fluorchinolon-Exposition beurteilen zu können, wurde entsprechend der allgemein akzeptierten Konsensustheorie die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration als relevanter Parameter für die Insulinsekretion analysiert. Ein hinreichend empfindliches Messverfahren, dass die direkte Analyse von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalen innerhalb lebender Einzelzellen unter Echtzeit(*real time*)-Bedingungen erlaubt, wird durch die im Verlauf der 1980er Jahre entwickelte und standardisierte ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie (Grynkiewicz, 1985; Tsien, 1980) repräsentiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten bereits in zahlreichen Arbeiten eindeutige Korrelationen zwischen den intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalen und der elektrischen Aktivität isolierter B-Zellen bzw. dem Ausmaß und dem Profil der Insulinsekretion nachgewiesen werden (Antunes et al., 2000; Grapengiesser et al., 1988; Rustenbeck et al. 2004, Santos et al., 1991).

Für die umfassende Beurteilung sowohl der betazytotropen Eigenschaften der Fluorchinolone sowie der Relevanz der induzierten Effekte für die Inhibierung des K_{ATP} -Kanals bzw. die Depolarisation der endokrinen B-Zellen wurde im Rahmen von elektrophysiologischen Messungen in der *whole cell*-Konfiguration das Membranpotential isolierter Einzelzellen während einer Fluorchinolon-Exposition charakterisiert.

Um Assoziationen zwischen den stereochemischen und strukturellen Eigenschaften der Fluorchinolone und den biologischen Effekten feststellen zu können, wurden zusätzlich *molecular modelling*-Studien durchgeführt. Ergänzt wurden die explizit für jedes Fluorchinolon-Derivat durchgeführten semiempirischen Berechnungen der Molekülgeometrie durch Konformationsanalysen und Berechnungen des elektrostatischen Potentials.

4.1 Spektrofluorimetrische Charakterisierung der endogenen Fluoreszenzeigenschaften ausgewählter Fluorchinolone

Analysiert wurde die Abhängigkeit der qualitativen und quantitativen Fluoreszenzeigenschaften von der Zusammensetzung des Mediums, wobei die Glucose-Konzentration des HEPES-gepufferten Krebs-Ringer-Mediums (KRHP) sowie die Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen in dem Medium besonders berücksichtigt wurden. Dies geschah im Hinblick auf die ausgeprägte Komplextierungstendenz der Fluorchinolone mit bi- bzw. polyvalenten Kationen (Mitscher, 2005), insbesondere mit freien Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen (Ross und Riley, 1992). Die Beeinflussung der Fluoreszenzintensität durch potentielle Interaktionen zwischen

den Fluorchinolonen und dem Serumprotein Albumin, das sich unter anderem in dem Kultivierungsmedium (KRHP) der isolierten B-Zellen des Pankreas befand, um Adhäsionen des sezernierten Insulins an den Oberflächen der Petrischalen oder der eingesetzten Versuchsgeräte bzw. Meßsysteme auszuschließen, wurde ebenfalls explizit analysiert.

4.1.1 Medien der Spektrofluorimetrie

Basierend auf den angeführten Überlegungen orientierte sich die Zusammensetzung der verwendeten Analyselösungen (s. Kap. 3.1.6) weitgehend an den Versuchsprotokollen der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie sowie dem Medium der Zellkultivierung, in dem sich die isolierten B-Zellen bis unmittelbar vor der Versuchsdurchführung befanden. Außerdem wurden die intrazellulären Verhältnisse, *i.e.* die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen sowie anderer polyvalenter Ionen, bei der Wahl geeigneter Solvenzien berücksichtigt. Dementsprechend wurde die Determinierung der Autofluoreszenz der einzelnen Fluorchinolone in vier verschiedenen Medien durchgeführt, die einen pH-Wert in einem Bereich von 7,0 bis 7,4 aufwiesen und mit einer Konzentration von 100 μM bzw. 200 μM der jeweiligen Testsubstanz substituiert wurden:

- 1) Aqua bidest.
- 2) Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP), modifiziert mit 3 mM bzw. 10 mM Glucose
- 3) Ca^{2+} -defizienter Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP I)
- 4) Ca^{2+} -defizienter Krebs-Ringer-HEPES-Puffer, substituiert mit 3 mM Glucose und 1% Albumin (KRHP II)

Hinsichtlich der Polarität der verwendeten Medien ist durch die Substitution des Krebs-Ringer-Mediums mit dem bovinen Serumprotein Albumin und dem organischen Bicarbonat-Puffer HEPES von einer geringeren Polarität als im Vergleich zu dem bidestillierten Wasser auszugehen. Ebenso ist anzunehmen, dass durch die Anwesenheit des Ca^{2+} -komplexierenden Chelators EGTA in den Ca^{2+} -defizienten Medien eine geringe Ionenstärke vorlag.

Da die Fluorchinolone Ciprofloxacin und Moxifloxacin für die experimentellen Untersuchungen nicht als Reinsubstanz, sondern ausschließlich in modifizierter Form als Infusionslösung zur Verfügung standen, wurden diese ebenfalls spektrofluorimetrisch analysiert. Die registrierten Exzitations- und Emissionsmaxima des Fluorchinolons Ciprofloxacin sind - ungeachtet des Lactat-Gehaltes (< 0,3 %) der Infusionslösung - durch

adäquate qualitative Eigenschaften wie die in Präsenz des Aqua bidest. analysierten Daten (s. Tab. 4.1.2.5) gekennzeichnet. Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung erfährt hingegen durch die Gegenwart bi- bzw. polyvalenter Ionen in den modifizierten Krebs-Ringer-Medien eine ausgeprägte hyperchrome Änderung, die zu einer Intensitätserhöhung um den Faktor 4 führt. Es sollten jedoch die unterschiedlichen Konzentrationen des Fluorchinolons sowie der bi- und polyvalenten Ionen in den Analysenlösungen und der Infusionslösung berücksichtigt werden.

Im Falle des Fluorchinolons Moxifloxacin erscheinen die korrespondierenden Exzitations- und Emissionsmaxima in Präsenz der Infusionslösung, die in geringen Konzentrationen Salzsäure, Natriumchlorid und Natriumhydroxid enthielt, im Vergleich zu den modifizierten Krebs-Ringer-Medien bei deutlich höheren Wellenlängen (Ex 430/ Em 505 *versus* Ex 355/ Em 465 [nm]). Demgemäß erfahren die qualitativen Fluoreszenzeigenschaften infolge der Verdünnung der Infusionslösung sowie der veränderten Ionenstärke und Polarität der Medien eine hypsochrome Verschiebung. Das Ausmaß der Strahlungsabsorption als auch der -emission wird - in Analogie zu dem Fluorchinolon Ciprofloxacin - durch die Anwesenheit bi- und polyvalenter Kationen um den Faktor 2 bis 3 erhöht.

Auf die explizite Darstellung der an dieser Stelle erläuterten Resultate, die auf vergleichbare Abhängigkeiten der Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone Ciprofloxacin und Moxifloxacin von der Konsistenz und der Ionenstärke der Medien hindeuten, wurde jedoch verzichtet, da sich alle hier vorgestellten Ergebnisse der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie sowie der *patch clamp*-Registrierungen auf Analysen beziehen, die durch 100-fache Verdünnung der Infusionslösung mit dem Krebs-Ringer-Basismedium hergestellt wurden.

4.1.2 Qualitative und quantitative Fluoreszenzeigenschaften ausgewählter Fluorchinolone

Die in den variablen Medien analysierten Fluoreszenzeigenschaften werden tabellarisch für jedes der untersuchten Fluorchinolone vorgestellt. Ergänzend werden die in Gegenwart des mit 10 mM Glucose modifizierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffers - dem Basismedium der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie - registrierten Exzitations- und Emissionsspektren graphisch dargestellt, die aufgrund der geringen Varianz für alle verwendeten Medien repräsentativ sind. Detaillierte Informationen über die Durchführungen der spektrofluorimetrischen Messungen sowie die Registrierungen der zwei- bzw. dreidimensionalen Contour-Plots (2D- bzw. 3D-Scans) werden in dem Kapitel 3.4.2 gegeben.

4.1.2.1 Lomefloxacin

Die endogenen Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Lomefloxacin werden durch die Konsistenz der verschiedenen Medien auf qualitativer als auch auf quantitativer Ebene moduliert (s. *Tab. 4.1.2.1*). Hervorzuheben ist die hypsochrome Verschiebung des Exzitations- bzw. des Emissionsmaximums, die bei dem Übergang von dem bidestillierten Wasser zu den modifizierten Krebs-Ringer-Medien registriert wurde. Die Präsenz bi- bzw. polyvalenter Ionen sowie des organischen Bicarbonat-Puffers HEPES und des Monosaccharids Glucose äußerte sich durch einen wahrnehmbaren Shift sowohl des Exzitations- als auch des Emissionsmaximums in den höherfrequenten Bereich (360 nm versus 340 nm bzw. 455 nm versus 425 nm).

Das Ausmaß der Hypsochromie wird durch die Glucose-Konzentration in dem Krebs-Ringer-Puffer beeinflusst: die Effizienz der Fluoreszenzanregung wurde proportional mit der Erhöhung der Glucose-Konzentration zu Gunsten der kürzeren Wellenlänge bei 340 nm gesteigert und in gleichem Maße bei 360 nm verringert. Das Maximum der induzierten Emissionsstrahlung wurde in einem adäquaten Ausmaß im Sinne einer Blauverschiebung in den Spektralbereich höherer Frequenzen verschoben.

Hinsichtlich der Modulation der qualitativen Fluoreszenzeigenschaften durch die Ca^{2+} -Konzentration verursachte die Präsenz freier Ca^{2+} -Kationen in dem umgebenden Medium eine bathochrome Verschiebung der maximalen Strahlungsabsorption, die einer Größenordnung von 15 nm bis maximal 20 nm entsprach. Die korrespondierenden Emissionsmaxima wurden dagegen nur geringfügig beeinträchtigt und waren in der Regel bei einer Wellenlänge von 425 nm lokalisiert.

Die Substitution des Ca^{2+} -freien Krebs-Ringer-Mediums mit dem Serumprotein Albumin korrelierte mit einer ausgeprägten Reduktion der ursprünglichen Fluoreszenzintensität von 6300 Einheiten – bezogen auf Messwerte, die in Gegenwart des mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-Mediums registriert wurden – um den Faktor 0,2. Demgegenüber wurden die qualitativen Fluoreszenzeigenschaften durch das Protein nicht wesentlich modifiziert; lediglich das Maximum der Strahlungsabsorption war durch eine hypsochrome Änderung um 5 nm gekennzeichnet.

Lomefloxacin			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	360	455
3 mM Glucosehaltiger KRHP	100	355	425
10 mM Glucosehaltiger KRHP	100	340	415
Ca ²⁺ -defizienter KRHP I	100	325	420
Ca ²⁺ -defizienter KRHP II	100	320	420

Tabelle 4.1.2.1 Endogene Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Lomefloxacin Die Emissions- und Exzitationsmaxima des Fluorchinolons Lomefloxacin wurden in definierten Medien mit variablen Ionenstärken und unterschiedlichen Glucose-Konzentrationen charakterisiert. Die Werte beziehen sich auf eine Fluorchinolon-Konzentration von jeweils 100 μM und wurden aus drei Einzelmessungen ermittelt.

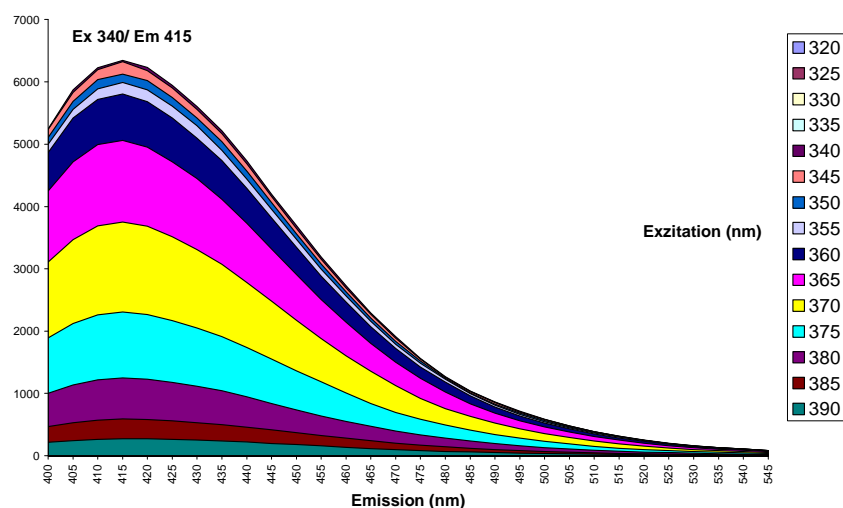


Abbildung 4.1.2.1 Emissionsspektrum des Fluorchinolons Lomefloxacin Für die Registrierung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der Exzitationsstrahlung wurde über einen Wellenlängenbereich von 400 nm bis 550 nm die endogene Fluoreszenzemission kontinuierlich innerhalb eines Spektralbereichs von 300 nm bis 390 nm angeregt. Das dargestellte Spektrum bezieht sich auf eine Konzentration von 100 μM der Testsubstanz, die in dem mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP) vorlag.

4.1.2.2 Norfloxacin

Norfloxacin			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	355	420
3 mM Glucose-haltiger KRHP	100	350	415
10 mM Glucose-haltiger KRHP	100	350	410
Ca ²⁺ -defizienter KRHP I	100	340	415
Ca ²⁺ -defizienter KRHP II	100	340	415

Tabelle 4.1.2.2 Spektrofluorimetrisch analysierte Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Norfloxacin In der Tabelle sind die registrierten Exzitations- und Emissionsmaxima in Abhängigkeit von der Konsistenz des Mediums zusammengefasst. Die dargestellten Mittelwerte beziehen sich auf eine Fluorchinolon-Konzentration von 100 μM und wurden jeweils aus drei Einzelmessungen berechnet.

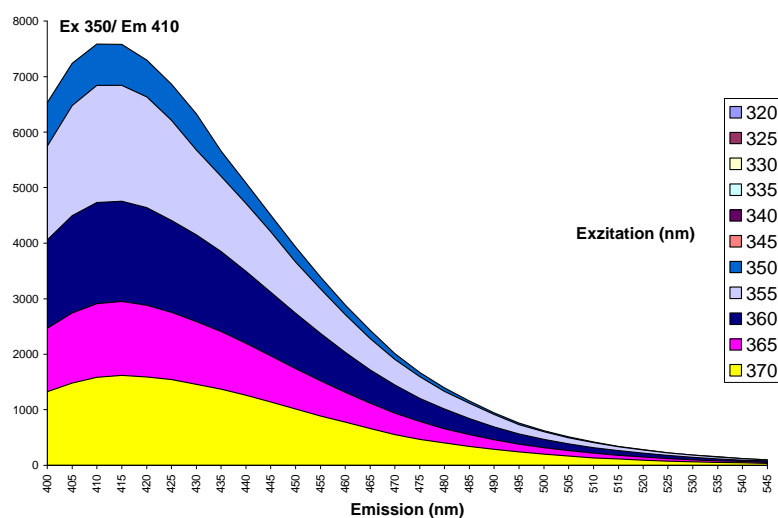


Abbildung 4.1.2.2 Emissionsspektrum des Fluorchinolons Norfloxacin Das Emissionsspektrum des Fluorchinolons wurde über einen Wellenlängenbereich von 400 nm bis 550 nm in Abhängigkeit von der Exzitationsstrahlung analysiert. Die Anregung erfolgte kontinuierlich bei äquidistanten Wellenlängen in einem Spektralbereich von 320 nm bis 370 nm. In dem mit 10 mM Glucose modifizierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP) befand sich eine Fluorchinolon-Konzentration von 100 μM .

Da sich dieser Vertreter der zweiten Generation durch die Abwesenheit des Fluorsubstituenten in der C8-Position und der Methyl-Gruppe an dem C7-Piperazyl-Ring von dem Struktur-Analogon Lomefloxacin differenziert, sind die endogenen Fluoreszenzeigenschaften durch divergente Qualitäten charakterisiert (s. *Tab. 4.1.2.2*). Das Maximum der Strahlungs-induzierten Fluoreszenz erscheint in Gegenwart von Aqua bidest. bei einer Wellenlänge von 420 nm (s. *Abb. 4.1.2.2*) und korrespondiert mit einem Exzitationsmaximum von 355 nm. In Relation zu Lomefloxacin findet sowohl die Exzitation als auch die Emission in dem Spektralbereich höherer Frequenzen statt. Auf quantitativer Ebene äußert sich die Abwesenheit des Fluor-Substituenten und der Methyl-Gruppe durch eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität - bezogen auf das Krebs-Ringer-Medium (10 mM) entspricht dies einer Differenz von durchschnittlich 1500 Fluoreszenzeinheiten.

Die in dem ionenfreien Aqua bidest. analysierten Exzitations- und Emissionsmaxima waren im Vergleich zu den Daten, die in Gegenwart der variablen Krebs-Ringer-Medien registriert wurden, bei höheren Wellenlängen lokalisiert. Das Ausmaß der bathochromen Verschiebung umfasste jedoch lediglich 5 nm bis maximal 10 nm. Die Intensität der Fluoreszenzstrahlung wurde demgegenüber durch die veränderte Ionenstärke und die Substitution der Medien mit dem organischen Puffer HEPES sowie dem Monosaccharid Glucose in einem höheren Maße modifiziert: die in dem bidestilliertem Wasser registrierte Fluoreszenzintensität wurde im Sinne einer hyperchromen Änderung um durchschnittlich 12 % bis 15 % gesteigert.

Die variable Glucose-Konzentration in dem umgebenden Medium zeigte weder auf die Absorptionseigenschaften des Fluorchinolons noch auf die Fluoreszenzaktivität eine modifizierende Wirkung. Lediglich die Intensität der emittierten Strahlung wurde in Gegenwart der höheren Glucose-Konzentration von 10 mM geringfügig reduziert.

Ähnlich wie bei dem Struktur-analogon Lomefloxacin korrelierte die Abwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen in dem Medium mit einer hypsochromen Verschiebung des relativen Absorptionsmaximums um 10 nm, während die maximale Emission der Fluoreszenzstrahlung unverändert bei 415 nm in Erscheinung trat.

Die Fluoreszenzintensität unterlag auch bei diesem Fluorchinolon einer Ca^{2+} -Abhängigkeit: in dem Ca^{2+} -defizienten Medium wurde die Intensität der Fluoreszenzemission in Bezug auf das in dem Krebs-Ringer-Medium (10 mM Glucose) registrierte Ausmaß um 15 % gesteigert. Die Substitution des Krebs-Ringer-Mediums mit dem Protein Albumin zeigte keinen modifizierenden Einfluss auf die Qualität der Fluoreszenz, führte

hingegen auf quantitativer Ebene zu einem ausgeprägten quenchenden Effekt, der die Intensität der Fluoreszenzemission um den Faktor 0,2 bis 0,3 reduzierte.

4.1.2.3 Gatifloxacin

Bemerkenswert ist bei diesem Fluorchinolon die Fähigkeit, Fluoreszenzstrahlung in dem blauen Bereich des sichtbaren UV-Spektrums bei einer Wellenlänge von 460 nm bzw. 465 nm zu emittieren (s. *Abb. Und Tab. 4.1.2.3*). Eine qualitativ vergleichbare Fluoreszenzaktivität ließ sich - mit Ausnahme des Strukturanalogons Moxifloxacin (s. *Abb. 4.1.2.4*) - bei keinem der anderen Fluorchinolone registrieren.

Ungeachtet der sehr analogen Substitutionsprofile der beiden Derivate Moxifloxacin und Gatifloxacin, deren Strukturen sich lediglich in der C7-Position durch die Wahl unterschiedlicher Heterocyklen mit basischen Eigenschaften voneinander differenzieren, unterliegen die quantitativen und qualitativen Fluoreszenzeigenschaften unterschiedlichen Einflüssen durch die variable Ionenstärke und Glucose-Konzentration der Medien. Dieser Sachverhalt äußert sich durch die im Gegensatz zu Moxifloxacin und den bisher vorgestellten Fluorchinolonen sehr konstanten Fluoreszenzqualitäten des Fluorchinolons Gatifloxacin (s. *Tab. 4.1.2.3*): die Exzitation der Anregungsstrahlung findet unabhängig von der Konsistenz des Medium mit maximaler Intensität bei 350 nm statt, wobei ein zweites Maximum geringerer Intensität bei einer Wellenlänge von 315 nm lokalisiert ist. Die korrespondierenden Emissionsmaxima erscheinen einheitlich in dem sichtbaren UV-Bereich bei 460 nm bzw. bei 465 nm.

Der Vergleich zwischen den in Aqua bidest. und in Gegenwart der modifizierten Krebs-Ringer-HEPES-Pufferlösungen registrierten Fluoreszenzdaten lässt bei diesem Fluorchinolon-Derivat Abhängigkeiten der Fluoreszenzintensität von der Ionenstärke und der Polarität des umgebenden Mediums erkennen. Diese Eigenschaft äußerte sich bei den Messungen durch den quenchenden Effekt, der sich bei dem Übergang von dem ionenfreien Medium (Aqua bidest.) zu dem Krebs-Ringer-Puffer offenbarte und die ursprüngliche Intensität (5200 Einheiten) um durchschnittlich 10 % reduzierte. Demgegenüber wirkte sich die Präsenz variabler Glucose- und Ca^{2+} -Konzentrationen nicht wesentlich modulierend auf die quantitativen Fluoreszenzeigenschaften aus. Die Abwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen korrelierte mit einem geringen Intensitätsverlust der Fluoreszenzemission um durchschnittlich 5 %.

Die Anwesenheit des Proteins Albumin induzierte eine ausgeprägte hypochrome Wirkung, die - bezogen auf die in dem Krebs-Ringer-Medium (10 mM Glucose) registrierte Fluoreszenzintensität - zu einer Reduktion der Fluoreszenzemission um 7 % führte.

Gatifloxacin			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	350	465
3 mM Glucosehaltiger KRHP	100	350	460
10 mM Glucosehaltiger KRHP	100	350	460
Ca^{2+} -defizienter KRHP I	100	350	465
Ca^{2+} -defizienter KRHP II	100	350	465

Tabelle 4.1.2.3 Endogene Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Gatifloxacin in Abhängigkeit von der Konsistenz des Mediums In der Tabelle sind die jeweils aus drei Einzelregistrierungen ermittelten Exzitationsmaxima und die korrespondierenden Fluoreszenzmaxima zusammengefasst. Die Messergebnisse beziehen sich auf einem Fluorchinolon-Gehalt von 100 μM in dem jeweiligen Medium.

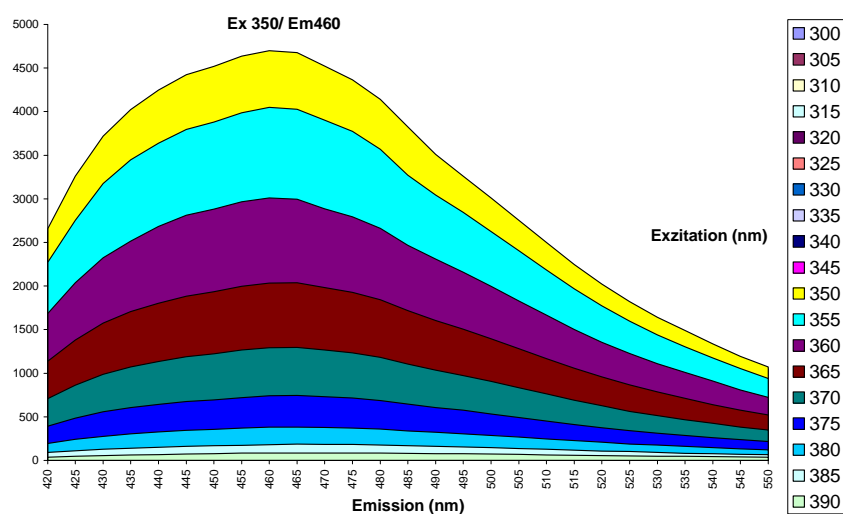


Abbildung 4.1.2.3 Emissionsspektrum des Fluorchinolons Gatifloxacin Die bei äquidistanten Wellenlängen über einen Bereich von 300 nm bis 400 nm angeregte Fluoreszenzstrahlung wurde in einem Wellenlängen-Intervall von 420 nm bis 590 nm kontinuierlich registriert und in Abhängigkeit von der Exzitationswellenlänge dargestellt. Die Bereiche gleicher Färbung repräsentieren identische Werte der relativen Fluoreszenzintensität. Das resultierende Emissionsspektrum bezieht sich auf eine Konzentration von 100 μM des Fluorchinolons, die in dem mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP) vorlag.

4.1.2.4 Moxifloxacin

Moxifloxacin			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	350	505
3 mM Glucose-haltiger KRHP	100	355	465
10 mM Glucose-haltiger KRHP	100	355	470
Ca^{2+} -defizienter KRHP I	100	365	470
Ca^{2+} -defizienter KRHP II	100	365	470

Tabelle 4.1.2.4 Qualitative Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Moxifloxacin Die korrespondierenden Emissions- und Exzitationsmaxima wurden in Gegenwart variabler Ca^{2+} - und Glucose-Konzentrationen analysiert. Ein besonderes Charakteristikum des methoxylierten Derivates ist die Emission besonders langwelliger Fluoreszenzstrahlung in dem blauen UV-VIS-Bereich.

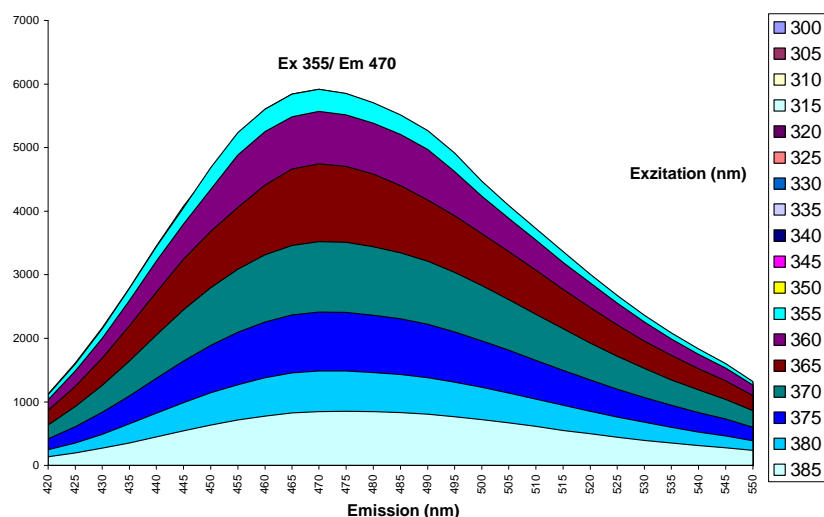


Abbildung 4.1.2.4 Emissionsspektrum des Fluorchinolons Moxifloxacin Die endogene Fluoreszenz des Fluorchinolons wurde in dem für die ratiometrischen Fluoreszenzmessungen relevanten Spektralbereich von 420 nm bis 550 nm bei äquidistanten Wellenlängen registriert und in Abhängigkeit von der Exzitationswellenlänge dargestellt. Die Bereiche einheitlicher Färbung repräsentieren identische Werte der relativen Fluoreszenzintensität. Das Spektrum wurden in dem mit 10 mM Glucose substituierten KRHP registriert und bezieht sich auf eine Konzentration von 100 μM Moxifloxacin.

Die endogenen Fluoreszenzeigenschaften des methoxylierten Fluorchinolons wurden durch die Präsenz bi- und polyvalenter Ionen sowie des Monosaccharids Glucose sowohl auf qualitativer als auch auf quantitativer Ebene moduliert (s. *Tab. 4.1.2.4*): Während das Maximum der Strahlungsabsorption durch den Medienwechsel einen bathochromen Shift erfuhr, wurde das korrespondierende Emissionsmaximum gemäß einer hypsochromen Änderung in den höherfrequenten Bereich verschoben. Gemäß diesen Eigenschaften zeigte sich in den spektrofluorimetrischen Messungen, dass das in dem ionenfreien Medium (Aqua bidest.) resultierende Fluoreszenzmaximum um 30 nm in den höherfrequenten Spektralbereich verschoben wurde. Das Ausmaß der Ionenstärke in den einzelnen Medien korrelierte zudem mit einer erheblichen Steigerung der Fluoreszenzintensität um nahezu 40 %. Die variierende Glucose-Konzentration in den substituierten Krebs-Ringer-Medien verursachte dagegen weder auf quantitativer noch auf qualitativer Ebene einen modifizierenden Effekt.

Die Fluoreszenzeigenschaften dieses Fluorchinolons sind durch einen Ca^{2+} -abhängigen Charakter gekennzeichnet, der sich im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Fluorchinolonen nicht durch eine Intensitätsminderung, sondern vielmehr durch eine Ca^{2+} -induzierte Steigerung der Fluoreszenzintensität um nahezu 10 % bis 12 % äußert. Hinsichtlich der Qualität der in den Messungen registrierten Fluoreszenzeigenschaften korrelierte die Abwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen in dem umgebenden Medium mit einem bathochromen Shift des Exzitationsmaximums um 10 nm, wohingegen das Maximum der Fluoreszenzemission unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration konstant bei einer Wellenlänge von 470 nm lokalisiert war.

Das Protein Albumin induzierte auch bei diesem Fluorchinolon eine hypochrome Änderung der Fluoreszenzintensität, die in Relation zu dem Glucose-haltigen Krebs-Ringer-Medium mit einer Reduktion des ursprünglichen Wertes von 6800 Fluoreszenzeinheiten um durchschnittlich 800 Einheiten einherging.

4.1.2.5 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin zeichnet sich in Analogie zu dem Fluorchinolon-Derivat Gatifloxacin ebenfalls durch sehr konstante Fluoreszenzqualitäten aus (s. *Tab. 4.1.2.5*), die unabhängig von dem externen Medium durch eine maximale Strahlungsemission in dem violetten Spektralbereich bei 420 nm charakterisiert ist. Die Exzitation erfolgt mit maximaler Intensität in dem für desoxymethylierte Fluorchinolon-Derivate charakteristischen Wellenlängenbereich bei 340 nm (s. *Abb. 4.1.2.5*). Ein zweites Exzitationsmaximum geringerer Strahlungsintensität ist in dem UV-Bereich des nicht sichtbaren Lichtes bei 305 nm lokalisiert.

Ciprofloxacin			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	340	440
3 mM Glucosehaltiger KRHP	100	340	420
10 mM Glucosehaltiger KRHP	100	340	420
Ca ²⁺ -defizienter KRHP I	100	340	420
Ca ²⁺ -defizienter KRHP II	100	340	420

Tabelle 4.1.2.5 Qualitative Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Ciprofloxacin Die Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons zeichnen sich unabhängig von der Konsistenz des Mediums durch besonders konstante Werte aus, bei denen es sich um Mittelwerte aus drei Einzelmessungen handelt. Die korrespondierenden Exzitations- und Emissionsmaxima beziehen sich auf eine Fluorchinolon-Konzentration von 100 μM .

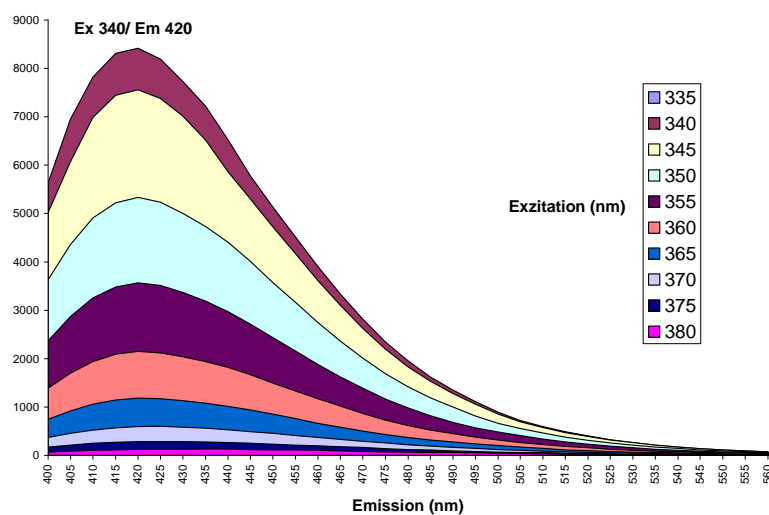


Abbildung 4.1.2.5 Emissionsspektrum des Fluorchinolons Ciprofloxacin Die Fluoreszenzintensität wurde in Abhängigkeit von der Exzitationsstrahlung bei äquidistanten Wellenlängen innerhalb eines Spektralbereichs von 400 nm bis 560 nm registriert. Die Flächen identischer Färbung repräsentieren definierte Werte der relativen Fluoreszenzintensität. Das dargestellte Emissionsspektrum wurde in Gegenwart des mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffers (KRHP) registriert und bezieht sich auf eine Fluorchinolon-Konzentration von 100 μM .

Ein wesentlicher Unterschied zu den methoxylierten Fluorchinolonen Gatifloxacin und Moxifloxacin ist die hohe Intensität der intrinsischen Fluoreszenzstrahlung des Fluorchinolons Ciprofloxacin. Die Fluoreszenzintensität erreicht ein Ausmaß von 8800 Einheiten und ist damit mit den o-fluorphenylierten Struktur-Analoga C2 und C4 sowie dem Fluorchinolon Norfloxacin vergleichbar, die ebenfalls - unter den gewählten Messbedingungen - intensive Fluoreszenzstrahlungen emittieren.

In den spektrofluorimetrischen Messungen zeigte sich, dass die in Anwesenheit des bidestillierten Wassers registrierte Emissionsstrahlung in Relation zu den ionenhaltigen und mit Glucose-substituierten Medien durch eine geringere Intensität gekennzeichnet war. Als weitere Konsequenz der divergenten Ionenstärke und Polarität, die in den einzelnen Krebs-Ringer-Puffermedien herrschten, erfolgte die maximale Emission der Fluoreszenzstrahlung in Abwesenheit von Ionen bei einer höheren Wellenlänge (440 nm versus 420 nm).

Variationen sowohl der Glucose- als auch der Ca^{2+} -Konzentration in dem umgebenden Medium zeigten keinen Einfluss auf die qualitativen Fluoreszenzeigenschaften. In Bezug auf die quantitativen Eigenschaften der Fluoreszenzaktivität korrelierte die Präsenz bivalenter Ca^{2+} -Ionen in dem Medium mit einer geringgradigen Quenchung der Fluoreszenzintensität: das ursprüngliche Ausmaß von durchschnittlich 8800 Fluoreszenzeinheiten wurde durch die bekannte Interaktion zwischen dem Fluorchinolon und den Ca^{2+} -Ionen um 200 bis 400 Einheiten reduziert. Demgegenüber führte die Substitution des Mediums mit dem Serumprotein Albumin zu einer weitaus intensiveren hypochromen Änderung, die zu einem Intensitätsverlust von nahezu 1000 Fluoreszenzeinheiten führte.

4.1.2.6 Dimethyliertes *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1

Die Ergebnisse der spektrofluorimetrischen Analyse des Fluorchinolons C1 reflektieren eine geringfügige Abhängigkeit der qualitativen Fluoreszenzeigenschaften von der variablen Konsistenz der Medien. Dies äußerte sich durch die geringe Varianz der in Gegenwart unterschiedlicher Ionen- und Glucose-Konzentrationen registrierten Ergebnisse (s. Tab. 4.1.2.6): das in dem jeweiligen Medium registrierte Exzitationsmaximum war in dem nicht sichtbaren UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 330 nm bzw. 345 nm lokalisiert, wobei ein zweites Maximum geringerer Intensität bei einer Wellenlänge von 300 nm registriert wurde. Die korrespondierende Strahlungsemission erreichte in dem violetten Spektralbereich bei einer Wellenlänge von 425 nm bzw. 435 nm maximale Intensitäten.

Dimethyliertes p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	345	435
3 mM Glucosehaltiger KRHP	100	345	425
10 mM Glucosehaltiger KRHP	100	340	425
Ca ²⁺ -defizienter KRHP I	100	345	425
Ca ²⁺ -defizienter KRHP II	100	345	425

Tabelle 4.1.2.6 Exzitations- und Emissionsmaxima des p-Fluorphenyl-Fluorchinolons C1 in Abhängigkeit von der Konsistenz des Mediums Die qualitative Fluoreszenzeigenschaft des Derivates C1 zeichnet sich durch konstante Werte aus. Die in Gegenwart der variablen Medien registrierten Daten repräsentieren Mittelwerte, die aus jeweils drei Einzelmessungen berechnet wurden.

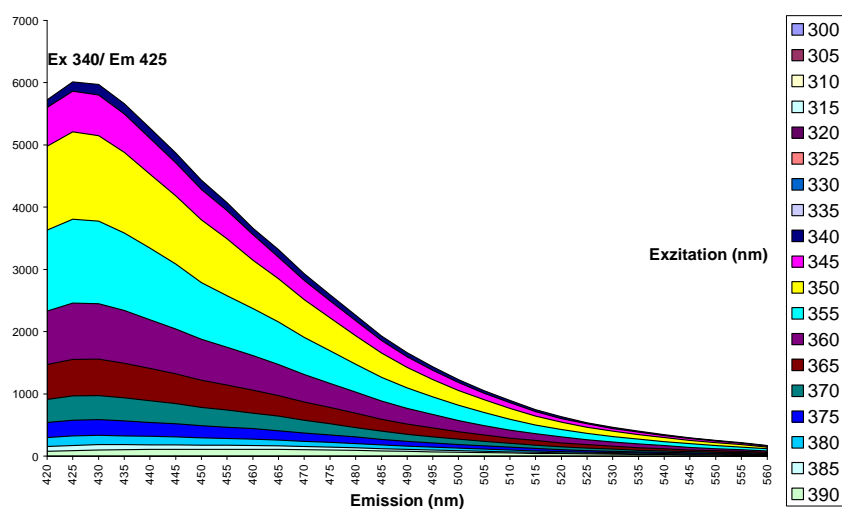


Abbildung 4.1.2.6 Emissionsspektrum des p-fluorphenylierten Fluorchinolons C1 Die Intensität der Strahlungsemission wurde über einen Spektralbereich von 420 nm bis 560 nm registriert und als Funktion der Exzitationswellenlänge dargestellt. Die relativen Werte der Fluoreszenzintensität werden durch Flächen einheitlicher Färbung repräsentiert. Das dargestellte Spektrum bezieht sich auf eine Konzentration von 100 μM des Fluorchinolons, die in dem mit 10 mM Glucose modifizierten Krebs-Ringer-Medium (KRHP) vorlag.

Der Vergleich zwischen den in Aqua bidest. analysierten Fluoreszenzintensitäten und den in Gegenwart der modifizierten Krebs-Ringer-Medien ermittelten Daten deutet auf eine hyperchrome Wirkung der bi- bzw. polyvalenten Ionen hin, deren Anwesenheit mit einer Steigerung der Fluoreszenzintensität um den Faktor 0,3 korreliert.

Hinsichtlich der Glucose-Abhängigkeit der Fluoreszenzaktivität verdeutlichte sich in den Messungen, dass die Erhöhung der Glucose-Konzentration von 3 mM auf 10 mM in dem Krebs-Ringer-HEPES-Puffer eine geringfügige Verschiebung des Exzitationsmaximums in den höherfrequenten Spektralbereich (5 nm) induzierte. Das korrespondierende Emissionsmaximum wurde demgegenüber weder auf qualitativer noch auf quantitativer Ebene modifiziert.

Die qualitativen Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons C1 wurden durch Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration in dem Krebs-Ringer-Medium nicht modifiziert, wohingegen die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung in Anwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen um 15 % - bezogen auf die in Gegenwart des Glucose-haltigen KRHPs registrierte Fluoreszenzintensität - reduziert wurde. Die Substitution des Mediums mit dem Protein Albumin verursachte, in Analogie zu den bisher vorgestellten Fluorchinolon-Derivaten, ebenfalls eine Quenchung der Fluoreszenzintensität.

4.1.2.7 Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2

Bei diesem Fluorchinolon, das als Konstitutions- bzw. Strukturisomer des Fluorchinolon-Derivates C1 aufzufassen ist, wurden ebenfalls nahezu konstante Fluoreszenzeigenschaften (s. *Tab. 4.1.2.7*) ermittelt. Basierend auf den nahezu identischen Molekülstrukturen, die sich lediglich durch die Positionierung des Fluoratoms an dem Phenyl-Substituenten in der N1-Position voneinander differenzieren, sind die Isomere C1 und C2 durch vergleichbare Fluoreszenzcharakteristika gekennzeichnet. Die maximale Absorption der Exzitationsstrahlung erfolgte in der Regel unabhängig von der Konsistenz des Mediums bei 345 nm, während das Maximum der Fluoreszenzemission in dem violetten Spektralbereich bei 425 nm lokalisiert ist (s. *Abb. 4.1.2.7*). Bemerkenswert ist jedoch, dass die von dem Strukturisomer C2 emittierte Fluoreszenzstrahlung wesentlich intensiver ausgeprägt ist, was auf eine effizientere Quantenausbeute hindeutet. Ein vergleichbares Ausmaß der Fluoreszenzemission wurde bei der Analyse des ebenfalls o-fluorphenylierten Fluorchinolon-Derivates C4 beobachtet, welches das desmethylierte Analogon des Fluorchinolons C2 darstellt.

Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	340	425
3 mM Glucose-haltiger KRHP	100	345	425
10 mM Glucose-haltiger KRHP	100	345	425
Ca ²⁺ -defizienter KRHP I	100	345	425
Ca ²⁺ -defizienter KRHP II	100	345	430

Tabelle 4.1.2.7 Endogene Fluoreszenzeigenschaften des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 in Präsenz variabler Glucose- und Ionenkonzentrationen Die korrespondierenden Exzitations- und Emissionsmaxima werden durch die Konsistenz des externen Milieus nicht wesentlich beeinflusst und zeichnen sich durch konstante Werte aus.

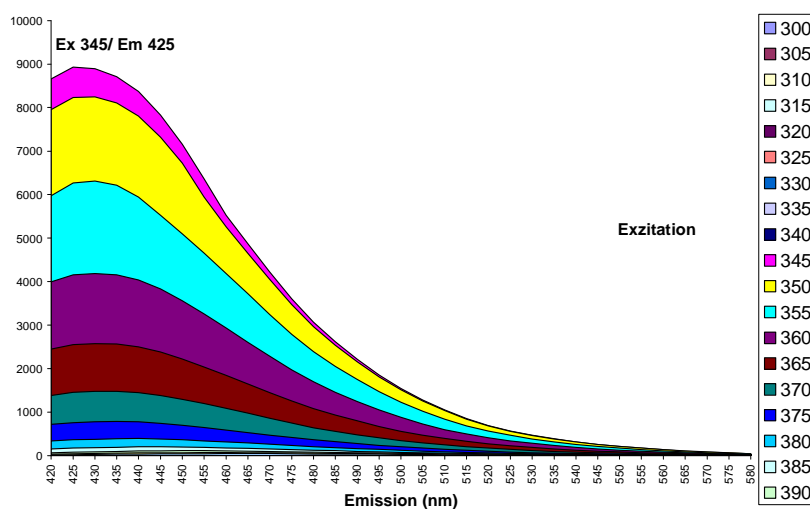


Abbildung 4.1.2.7 Emissionsspektrum des o-fluorphenylierten Fluorchinolons C2 Die strahlungsinduzierte Fluoreszenzintensität wurde bei äquidistanten Wellenlängen in einem Intervall von 420 nm bis 580 nm registriert und in Abhängigkeit von der Exzitationswellenlänge dargestellt. Das Fluorchinolon C2, welches in einer Konzentration von 100 μM in dem mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP) vorlag, wurde mit einer spektralen Bandweite von 5 nm kontinuierlich durch Strahlung des ultravioletten Spektrums von 300 nm bis 390 nm angeregt.

In Analogie zu den congeneren Fluorchinolonen C1, C3 und C4 war die von dem congeneren Derivat C2 emittierte Fluoreszenzstrahlung in Gegenwart des bidestillierten Wassers durch eine geringe Intensität gekennzeichnet. Durch den Übergang in das Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltige Krebs-Ringer-Medium und die damit einhergehende Erhöhung der Ionenstärke, wurde die Fluoreszenzintensität um den Faktor 0,2 gesteigert.

Die variable Glucose- und Ca^{2+} -Konzentrationen der Pufferlösungen bewirkten, wie bereits erwähnt, bei diesem Fluorchinolon-Derivat Modifizierungen der quantitativen Fluoreszenzeigenschaften, die sich in der Regel durch hypochrome Änderungen der emittierten Strahlung verdeutlichten. Die Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen verursachte einen quenchenden Effekt, der eine Reduktion der Fluoreszenzintensität - ausgehend von 9700 Einheiten (KRHP II) - um durchschnittlich 600 Einheiten verursachte. Eine vergleichbare Reduktion der emittierten Strahlungsintensität wurde durch das Serumprotein Albumin induziert, wohingegen Variationen der Glucose-Konzentration keinen bedeutenden Einfluss auf die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung hervorriefen.

4.1.2.8 *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)

Die Autofluoreszenz des Fluorchinolons C3 ist, ungeachtet der Abwesenheit der Methyl-Gruppen an dem Piperazyl-Ring in der C7-Position, durch gleichwertige qualitative und quantitative Eigenschaften wie die endogenen Fluoreszenzeigenschaften der Isomere C1 und C2 gekennzeichnet (s. Tab. 4.1.2.8). Nahezu unabhängig von der Konsistenz des Mediums und der Glucose-Konzentration wird die Exzitationsstrahlung bei 340 bzw. 345 nm mit maximaler Intensität absorbiert, während das Maximum der korrespondierenden Fluoreszenzemission in dem violetten Spektralbereich bei einer konstanten Wellenlänge von 425 nm erscheint (s. Abb. 4.1.2.8).

Der Übergang von dem polaren und Ionen-defizienten Aqua. bidest. zu den Medien höherer Ionenstärke, die zusätzlich Glucose und den organischen Bicarbonat-Puffer HEPES enthielten, führte bei den spektrofluorimetrischen Messungen zu einer mäßig ausgeprägten Erhöhung der Fluoreszenzintensität.

Der modifizierende Effekt polyvalenter Ionen, insbesondere freier Ca^{2+} -Ionen, zeigte auf qualitativer Ebene keinen bedeutenden Einfluss, wohingegen auf quantitativer Ebene die Intensität der Fluoreszenzstrahlung in Abwesenheit freier Ca^{2+} -Kationen im Sinne einer hyperchromen Wirkung erhöht wurde. Demgemäß verursachte die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration einen geringgradigen quenchenden Effekt, der einen Intensitätsverlust um durchschnittlich 5 % induzierte.

p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	340	425
3 mM Glucosehaltiger KRHP	100	345	425
10 mM Glucosehaltiger KRHP	100	345	425
Ca^{2+} -defizienter KRHP I	100	345	425
Ca^{2+} -defizienter KRHP II	100	345	430

Tabelle 4.1.2.8 Endogene Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Sarafloxacin (C3) Die korrespondierenden Exzitations- und Emissionsmaxima wurden in Gegenwart variabler Ca^{2+} - und Glucose-Konzentrationen sowie des Serumproteins Albumin registriert. Die Qualität der Autofluoreszenz ist mit den Fluoreszenzeigenschaften der Struktur-Analoga C1 und C2 nahezu identisch.

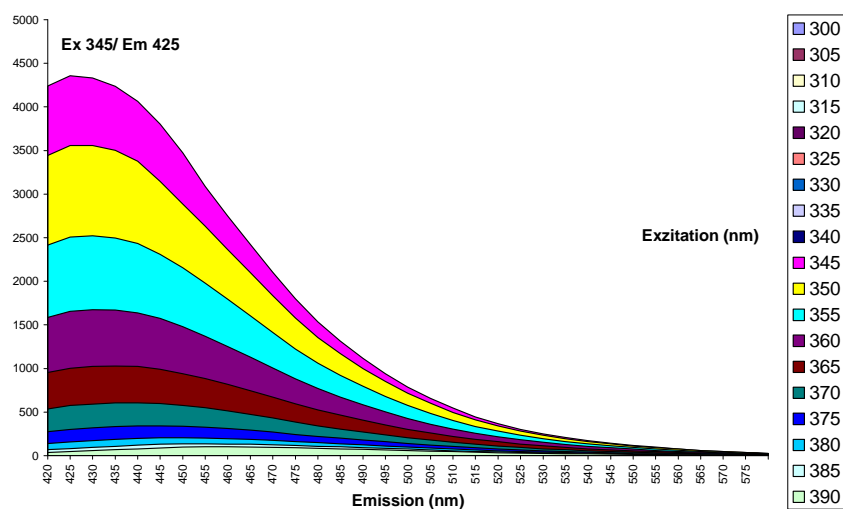


Abbildung 4.1.2.8 Emissionsspektrum des Fluorchinolons Sarafloxacin (C3) Die über das Wellenlängen-Intervall von 300 nm bis 390 nm angeregte Fluoreszenzstrahlung wurde in Abhängigkeit von der Exzitation innerhalb eines Spektralbereichs von 420 nm bis 580 nm bei äquidistanten Wellenlängen registriert. Das resultierende Emissionsspektrum wurde in Präsenz des mit 10 mM Glucose modifizierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffers (KRHP) registriert, in dem sich 100 μM des Fluorchinolons C3 befanden.

Wesentlich deutlicher wirkte sich die quenchende Wirkung des Serumproteins Albumin aus, die - bezogen auf die in dem mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-Medium (KRHP I) registrierten Daten - mit einer Reduktion der ursprünglichen Intensität um 8 % einherging.

4.1.2.9 *o*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4

Hinsichtlich der strukturellen Ähnlichkeiten, die zwischen den Isomeren C3 und C4 bestehen, sind die optischen Eigenschaften des Fluorchinolons C4 durch einen vergleichbaren konstanten Charakter wie die intrinsische Fluoreszenz des Strukturisomers C3 gekennzeichnet (s. Tab. 4.1.2.9). Die korrespondierenden Absorptions- und Emissionsmaxima sind in dem mittleren UV-Bereich bei 345 nm bzw. in dem violetten Spektralbereich bei 430 nm lokalisiert (s. Abb. 4.1.2.9).

Die Resultate der spektrofluorimetrischen Analyse dokumentieren, dass die Intensität der emittierten Fluoreszenz durch die variable Konsistenz des Mediums sowie die divergente Ionenstärke nicht wesentlich beeinträchtigt wurde. Das Ausmaß der maximalen Strahlungsemission des *o*-fluorphenylierten Fluorchinolons C4 entsprach derjenigen Intensität, die von dem dimethylierten Analogon C2 emittiert wurde. Die Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen bzw. des Proteins Albumin induzierte auch bei diesem Derivat eine quenchende Wirkung: die in dem Ca^{2+} -defizienten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP I) registrierte maximale Strahlungsemission von 9100 Einheiten wurde durch die Interaktion mit freien Ca^{2+} -Ionen um 800 Einheiten bzw. in Gegenwart des Albumins um 1500 Einheiten reduziert.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse der spektrofluorimetrischen Registrierungen, dass die Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone auf qualitativer Ebene in der Regel durch zwei Exzitationsmaxima in einem Wellenlängenbereich von 305 nm bis 310 nm bzw. 320 bis 360 nm charakterisiert sind. Bei allen analysierten Derivaten dominiert das in dem längerwelligen Bereich lokalisierte Maximum, wobei das Ausmaß der Strahlungsabsorption bei dem ersten Maximum strukturabhängig deutlich schwächer ausgeprägt ist. Die korrespondierenden Emissionsmaxima sind in der Regel in dem violetten Spektralbereich (420 nm bis 440 nm) lokalisiert. Die methoxylierten Derivate Moxifloxacin und Gatifloxacin zeichnen sich in Relation zu den desmethoxylierten Fluorchinolonen durch die Emission von besonders langwelliger Fluoreszenzstrahlung aus, die in dem violett-blauen Bereich des UV-VIS-Spektrums (460 nm bis 470 nm) maximale Intensitäten erreicht. Als gemeinsames Charakteristikum der Fluorchinolone ist die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung in Präsenz bi- bzw. polyvalenter Kationen höher ausgeprägt als in dem ionenfreien Medium.

o-Fluorphenyl-Derivat C4			
Medium	Konzentration [μM]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
Aqua bidest.	100	345	430
3 mM Glucose-haltiger KRHP	100	345	430
10 mM Glucose-haltiger KRHP	100	345	430
Ca^{2+} -defizienter KRHP I	100	345	430
Ca^{2+} -defizienter KRHP II	100	345	430

Tabelle 4.1.2.9 Endogene Fluoreszenzeigenschaften des o-fluorphenylierten Fluorchinolons C4 in Abhängigkeit von der Konsistenz des Mediums Die in Präsenz variabler Ca^{2+} - und Glucose-Konzentrationen registrierten Exzitations- und Emissionsmaxima zeichnen sich durch sehr konstante Werte aus.

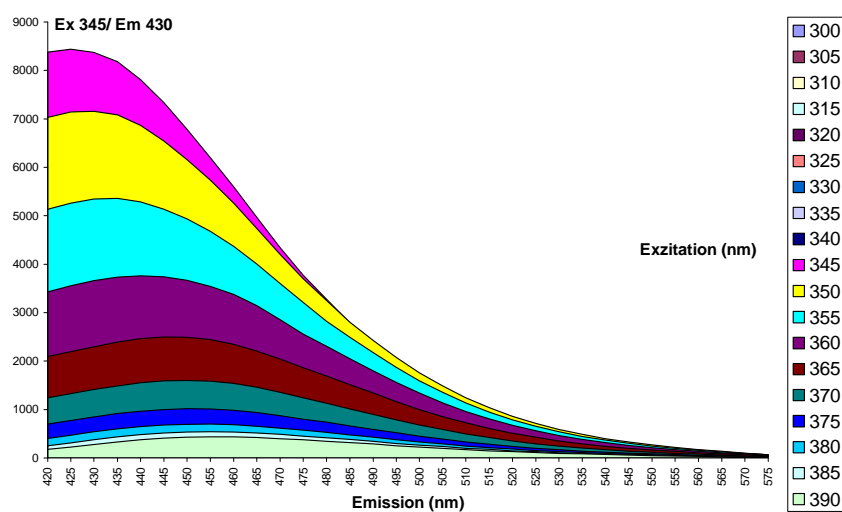


Abbildung 4.1.2.9 Emissionsspektrum des o-fluorphenylierten Fluorchinolons C4 Die innerhalb eines Wellenlängen-Intervalls von 280 nm bis 375 nm kontinuierlich angeregte Fluoreszenzstrahlung wurde mit einer Schrittweite von 5 nm über einen Spektralbereich von 410 nm bis 590 nm registriert und in Abhängigkeit von der Exzitation dargestellt. Die Bereiche gleicher Färbung repräsentieren identische Werte der relativen Fluoreszenzintensität. Das resultierende Emissionsspektrum bezieht sich auf eine Fluorchinolon-Konzentration von 100 μM , die in dem mit 10 mM Glucose substituierten Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (KRHP I) vorlag.

Die Verringerung der Ionenstärke (Aqua bidest.) korreliert mit einer hypochromen Intensitätsänderung um den Faktor 0,2 bis 0,3. Bezüglich der Polarität des Mediums wird mit steigender Polarisierbarkeit das Emissionsmaximum bathochrom verschoben

Die congeneren Strukturisomere C1 und C2 bzw. C3 und C4 sind durch vergleichbare, in einigen Fällen sehr homologe Eigenschaften gekennzeichnet. Die Substanz-spezifischen Exzitationsmaxima sind in dem nicht-sichtbaren UV-Bereich bei 345 nm lokalisiert, wobei in der Regel bei einer Wellenlänge von 300 nm ein zweites Exzitationsmaximum geringerer Intensität vorliegt. Die induzierte Autofluoreszenz erreicht innerhalb des violetten Spektralbereiches bei einer Wellenlänge von 425 nm bzw. 430 nm maximale Werte. Bezüglich der quantitativen Fluoreszenzaktivität determiniert die ortho- bzw. para-Stellung des Fluoratoms an dem N1-Phenyl-Substituenten das Ausmaß der Fluoreszenzintensität: die Fluorierung in ortho-Stellung ist im Vergleich zu der para-Stellung mit einer Intensitätssteigerung um 10 % bis maximal 15 % assoziiert.

Im Hinblick auf potentielle Interaktionen zwischen den Komponenten der Medien und den untersuchten Fluorchinolonen wird ersichtlich, dass die variablen Glucose- und Ca^{2+} -Konzentrationen die Qualität der Fluoreszenzemission nur geringfügig bis moderat determinieren. Es zeigt sich jedoch, dass die in dem ionenfreien bidestillierten Wasser registrierten Emissionsmaxima bei einigen Fluorchinolon-Derivaten in dem längerwelligen UV-Bereich lokalisiert sind. Dieses Verhalten wurde insbesondere bei den Fluorchinolonen Moxifloxacin (505 nm) und Ciprofloxacin (440 nm) beobachtet. Die Exzitations-eigenschaften der Fluorchinolone unterliegen ebenfalls einer geringe Varianz, die im Wesentlichen durch die Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst wird: bei den Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin korreliert die Anwesenheit freier Ca^{2+} -Ionen mit einer bathochromen Verschiebung der Exzitationsmaxima, während bei Moxifloxacin eine hypsochrome Änderung verursacht wird. Demgegenüber werden die Emissionsmaxima durch die variable Zusammensetzung des Krebs-Ringer-HEPES-Puffers nur unwesentlich modifiziert; diese sind durch relativ konstante Werte in dem violetten Bereich des UV-VIS-Spektrums charakterisiert. Besonders hervorzuheben sind die gleichförmigen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone Ciprofloxacin und Gatifloxacin sowie der fluorphenylierten Isomere C1 und C2 bzw. C3 und C4.

Auf quantitativer Ebene verdeutlichen die ermittelten Daten, dass die Intensität der Fluoreszenzemission Substanz-abhängig durch die Konzentrationen der bi- bzw. polyvalenten Ionen sowie des Proteins Albumin und in sehr geringem Maße durch die

Glucose-Konzentration determiniert wird. Dieser Sachverhalt offenbart sich insbesondere in Anwesenheit des Albumins, das bei allen analysierten Fluorchinolonen mit einem quenchenden Effekt in einer Größenordnung von durchschnittlich 800 bis 2000 Einheiten - entsprechend 7 % bis maximal 15 % - korreliert. Hypochrome Änderungen der Fluoreszenz-emissionen werden ebenfalls in Gegenwart freier Ca^{2+} -Ionen offensichtlich, die in der Regel eine moderate bis geringfügige Reduktion der Fluoreszenzintensität (800 bis 900 Einheiten) hervorrufen. Demgegenüber erweisen sich die quantitativen Fluoreszenz-eigenschaften der Fluorchinolone von Variationen der Glucose-Konzentration relativ unabhängig.

In Bezug auf die ratiometrischen Fluoreszenzmessungen belegen die Ergebnisse der charakterisierten Fluoreszenzeigenschaften sowohl für die therapeutisch relevanten Fluorchinolone als auch die Strukturisomere C1 und C2 sowie C3 und C4 Interferenzen mit der Fura-2-basierenden Fluoreszenzemission. Dies betrifft insbesondere das in Gegenwart hoher Ca^{2+} -Konzentrationen dominierende Absorptionsmaximum λ_{340} des Indikators Fura-2 (Molecular Probes, 2003). Die Intensität der korrespondierenden Emissionsstrahlung, die in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration bei einer Wellenlänge von 505 nm bzw. 510 nm ein Maximum aufweist (Molecular Probes, 2003; Takahashi et al., 1999), wird entsprechend den ermittelten Fluoreszenzdaten durch die Autofluoreszenz der Fluorchinolone zusätzlich gesteigert. Als Konsequenz dieser artifiziellen Störsignale resultieren erhöhte Werte der Fura-Fluoreszenz-Ratio, die nicht die realen Verhältnisse der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reflektieren. Dementsprechend war es erforderlich, durch die Entwicklung eines geeigneten Korrekturverfahrens, zwischen den Werten der ausschließlich Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio und der Autofluoreszenz der untersuchten Fluorchinolone zu differenzieren (s. Kap. 3.5.6).

4.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus

Die Ergebnisse der ratiometrischen Fura-2-basierten Fluoreszenzmessungen werden explizit für jedes Fluorchinolon-Derivat vorgestellt, wobei die unkorrigierten Daten – definiert als *Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio* – sowie die korrigierten, ausschließlich Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignale – entsprechend als *Fura-Nettofluoreszenz-Ratio* charakterisiert – in Relation zueinander dargestellt werden. Aufgrund der in der Regel konstanten Intensität der Fluorchinolon-spezifischen Fluoreszenzemission wird auf die separate Darstellung der endogenen Fluoreszenzemission sowie der entsprechenden Ratio verzichtet.

Die Dissoziation zwischen der Fluorchinolon-spezifischen Autofluoreszenz und der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio basiert auf dem in Kapitel 3.5.6 erläuterten Prinzip. Um das Korrekturverfahren näher zu veranschaulichen, werden in diesem Kapitel die für die Struktur-Analoga Norfloxacin (s. Abb. 3.5.6.1) und Lomefloxacin (s. Abb. 3.5.6.2 (A) bis (C)) bei den Exzitationsmaxima 340 nm und 380 nm induzierten Fluoreszenzemissionen sowie die korrespondierenden Ratio-Werte in Abhängigkeit von der Zeit vorgestellt.

Als etablierte Messobjekte wurden primär kultivierte, endokrine B-Zellen weiblicher NMRI-Albinomäuse analysiert, die hinsichtlich des heterogenen Genpools dieser Maus-Linie eine Aussage über die physiologischen Verhältnisse der Stimulus-Sekretions-Kopplung zulassen. In einigen Experimenten wurden die undissoziierten, intakten Langerhans-Inseln verwendet, so dass Vergleiche gezogen bzw. Differenzen zwischen diesen beiden Messmodellen beurteilt werden konnten. Darüber hinaus ermöglichte die Verwendung von Pankreasinseln die Herstellung einer direkten Beziehung zu den an anderer Stelle analysierten Effekten der Fluorchinolone gegenüber der Insulin-Sekretion.

Die funktionelle Integrität und elektrische Aktivität der auf Deckgläschen kultivierten B-Zellen sowie Langerhans-Inseln wurden durch die extrazelluläre Exposition mit einer maximal depolarisierenden K^{+} -Konzentration (49,5 mM) belegt. Dieser Stimulus evoziert unabhängig von der Glucose-Konzentration eine effiziente Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Gilon und Henquin, 1992; Rustenbeck, 1999). Gleichzeitig diente das Ausmaß der induzierten K^{+} -Depolarisation als interner Standard für die Beurteilung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -modulierende Potenz der untersuchten Fluorchinolone. Die Kontrollphase wurde initial von Minute 10 bis Minute 20 vor der eigentlichen Exposition mit der jeweiligen Testsubstanz durchgeführt. Die interindividuelle Variabilität der physiologischen Verhältnisse wurde dadurch berücksichtigt, dass für die Berechnung der Mittelwerte \pm SEM der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio bzw. Fura-Nettofluoreszenz-Ratio

pankreatische B-Zellen aus mindestens drei verschiedenen NMRI-Albinomäusen analysiert wurden.

Um Aussagen sowohl über den qualitativen als auch den quantitativen Charakter der Fluorchinolon-induzierten Wirkung gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration formulieren zu können, wurde initial von Minute 1 bis Minute 10 das Ca^{2+} -Signalprofil während eines mäßig effektiven Glucose-Stimulus (10 mM) unter physiologischen Bedingungen untersucht. Diese Versuchsphase diente gleichermaßen der Äquilibration der während eines Zeitraumes von mindestens 18 Stunden kultivierten B-Zellen an die herrschenden Versuchsbedingungen.

Die Beteiligung eines Ca^{2+} -Influx aus dem externen Medium bzw. dem extrazellulären Raum, der gemäß der Konsensustheorie über die Stimulus-Sekretions-Kopplung vorwiegend über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (VDCC) des L-Typus vermittelt wird (Rorsman und Trube, 1986; Plant 1988), ist pharmakologisch durch den Einsatz von Dihydropyrimidinen oder Phenylalkylaminen nachweisbar. Demgemäß wurden die Zellen in Präsenz der jeweiligen Fluorchinolone zusätzlich von Minute 45 bis Minute 60 einer Exposition mit dem Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Methoxyverapamil (D600) in einer maximal inhibitorischen Konzentration von 50 μM ausgesetzt. Der unterschiedliche Beitrag der untersuchten Fluorchinolon-Derivate sowie des Antagonisten D600 an dem Ausmaß des Effektes wurde durch die Fortsetzung der D600-Exposition in Abwesenheit des Fluorchinolons von Minute 60 bis Minute 70 beurteilt.

4.2.1 Modifizierender Effekt eines mäßig effektiven Glucose-Stimulus gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen des Pankreas

Die Exposition der durch direkte Collagenase-Injektion aus dem exokrinen Pankreas (s. Kap. 3.3.2) isolierten und während einer Inkubationsphase von 18 Stunden kultivierten B-Zellen mit einer Glucose-Konzentration von 10 mM induzierte eine mäßig ausgeprägte Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (s. Abb. 4.2.1). Bedingt durch die Phasenverschiebung der für die einzelnen B-Zellen berechneten Kinetiken, war das oszillierende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Profil weniger durch periodische Signale, sondern vielmehr durch unregelmäßige Fluktuationen gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass durch die Aufhebung der elektrischen Kopplung zwischen den einzelnen B-Zellen die synchronen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen grundsätzlich in unregelmäßige Fluktuationen überführt werden. Dieses Phänomen trat bei denjenigen B-Zellen, die nach dem direkten Collagenase-Digestions-Verfahren (s. Kap. 3.3.2) aus dem exokrinen Pankreas isoliert und in einem mit 10

mM Glucose substituierten Medium kultiviert wurden mit besonderer Intensität in Erscheinung.

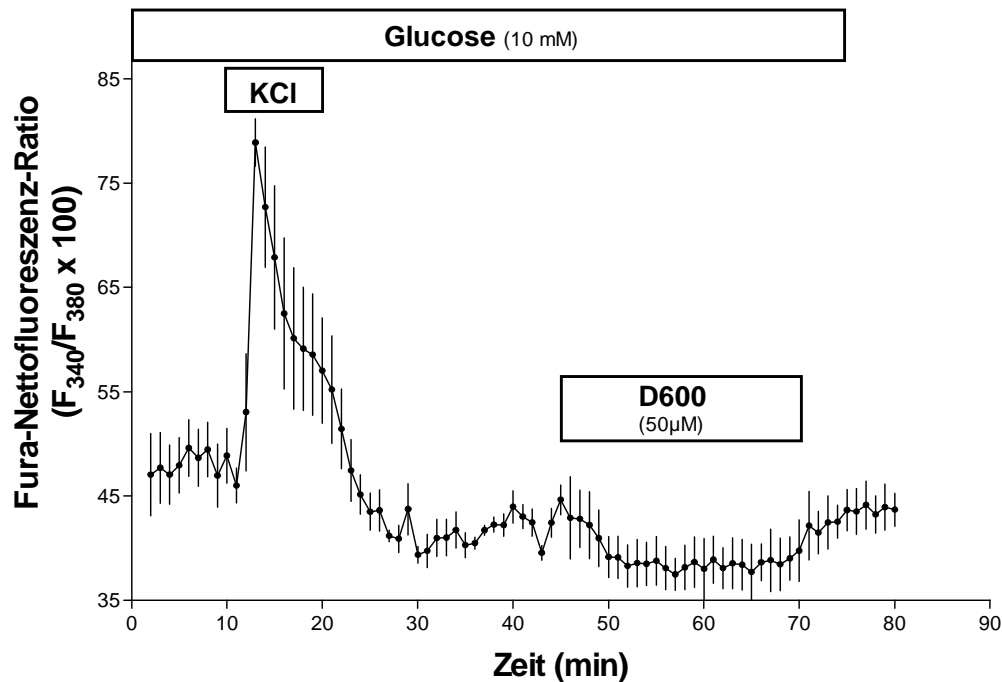


Abbildung 4.2.1. Modulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen des Pankreas durch einen moderaten Glucose-Stimulus von 10 mM Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurden als korrigierte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (s. Kap. 3.5.6) in Abhängigkeit von der Zeit registriert. Die kontinuierliche Perifusion der endokrinen B-Zellen erfolgte in Präsenz von 10 mM Glucose über einen Zeitraum von 80 Minuten. Die funktionelle Integrität der endokrinen B-Zellen wurde durch die charakteristische Ansprechbarkeit gegenüber einem exogenen K^+ -Stimulus (49,5 mM) belegt. Die Abhängigkeit des Glucose-induzierten Effektes von einem ionogenen Influx exogener Ca^{2+} -Kationen, der überwiegend über den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal vermittelt wird, wurde durch die Perifusion der B-Zellen mit Methoxyverapamil (D600) analysiert, das sich von Minute 45 bis Minute 70 in dem Medium befand. Dargestellt sind die aus drei Versuchszyklen berechneten Mittelwerte \pm SEM, in denen insgesamt 22 Fura-2-inkubierte sowie 21 schein-inkubierte B-Zellen aus drei Präparationen perfundiert wurden.

Die moderate insulinotrope Potenz des Glucose-Stimulus bewirkte in Relation zu der experimentell induzierten K^+ -Depolarisation, die in der Kontrollphase von Minute 10 bis Minute 20 erzeugt wurde, einen marginalen Anstieg der Nettofluoreszenz-Ratio, die mit einer geringen Amplitude um ein basales Niveau von 47 Einheiten fluktuierte. Wie zu erwarten, reagierten die endokrinen B-Zellen mit der charakteristischen Ansprechbarkeit auf den maximal depolarisierenden Effekt der 49,5 mM Kaliumchlorid-Lösung. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration setzte mit einer Latenz von einer Minute ein und zeigte innerhalb der nächsten zwei Minuten eine effiziente Steigerung auf einen maximalen Wert

von 115 Ratio-Einheiten. Dieser mit einer prompten Kinetik einsetzende Effekt konnte bei allen funktionell intakten B-Zellen des Pankreas evoziert werden. Der transiente Charakter der K^+ -Depolarisation zeigte sich bereits in der nachfolgenden Minute durch eine progrediente Verringerung der Fluoreszenz-Ratio, die sich bei Minute 17 auf einem plateauförmigen Niveau äquilibrierte.

Bedingt durch die Beendigung der K^+ -Exposition und die nachfolgende Äquilibration der prästimulatorische K^+ -Konzentration von 5,9 mM war der weitere Verlauf des Signalprofils von Minute 21 bis Minute 27 durch eine abrupte Reduktion unterhalb des Basisniveaus gekennzeichnet. Während der nachfolgenden Perifusionsphase mit dem Glucose-haltigen Krebs-Ringer-Basismedium setzte sich die Reduktion der Fluoreszenz-Ratio kontinuierlich fort, um bei Minute 30 einen *steady state*-Zustand von 38 Einheiten zu erreichen. In dieser Versuchsphase setzten die bereits in der initialen Äquilibrationsphase von Minute 0 bis Minute 10 registrierten Fluktuationen erneut ein.

Die Glucose-initiierte Stimulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration reagierte sensitiv gegenüber der Präsenz von Methoxyverapamil (D600), einem selektiven Antagonisten des spannungskontrollierten L-Typ- Ca^{2+} -Kanals der Plasmamembran. Dieser befand sich ab Minute 45 in dem Medium und verursachte mit einer langsamen Kinetik eine moderate Reduktion der Fluoreszenz-Ratio in einem Ausmaß von sieben Einheiten. Als Konsequenz der D600-vermittelten Antagonisierung des Influx freier Ca^{2+} -Kationen aus dem externen Medium wurden das fluktuierende Signalprofil auf eine konstante Ratio von annähernd 37 Einheiten supprimiert. In der Gesamtheit verursachte der Inhibitor D600 in einer Konzentration von 50 μ M eine wahrnehmbare Verringerung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio um zehn Einheiten sowie eine effiziente Aufhebung der Glucose-stimulierten Fluktuationen.

Die vollständige Reversibilität des D600-initiierten Antagonismus wurde nach Beendigung der D600-Exposition von Minute 45 bis Minute 70 durch eine kontinuierliche Erhöhung des Signalprofils ersichtlich. Die nachfolgende Stabilisierung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio auf die initialen, prästimulatorischen Werte erfolgte - ähnlich wie das Einsetzen des D600-Effektes - mit einer verzögerten Kinetik, so dass die charakteristischen Ca^{2+} -Fluktuationen erst in der terminalen Versuchsphase bei Minute 77 das ursprüngliche Ausmaß von nahezu 47 Einheiten erreichten.

4.2.2 Beeinträchtigung der Fura-Fluoreszenz-Ratio durch artifizielle Fluoreszenz-signale

Um die Beeinflussung der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Nettofluoreszenz-Ratio durch artifizielle Signale des Perifusionsmediums sowie der isolierten B-Zellen des Pankreas, in deren Zytosol sich unter anderem die fluoregenen Reduktionsäquivalente NAD(P)H und FADH befinden (Patterson et al., 2000), zu beurteilen, wurden Kontrollversuche durchgeführt. Außerdem wurde mit Hilfe dieser Versuchskonstellation mögliche Beeinträchtigungen der Messergebnisse durch endogene Fluoreszenzeigenschaften des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Methoxyverapamil (D600) untersucht.

Die Durchführung der Perfusionen erfolgte nach dem gleichen Versuchsprotokoll, das bei der Analyse der Ca^{2+} -modulierenden Eigenschaften der Fluorchinolone zu Grunde lag. Lediglich die Versuchsphase von Minute 30 bis Minute 60, in der die Exposition mit den verschiedenen Testsubstanzen stattfand, wurde bei den Kontrollversuchen mit dem unmodifizierten Krebs-Ringer-Basismedium in Präsenz von 10 mM Glucose durchgeführt.

Die Resultate der mit einer Verzögerung von achtzig Minuten hintereinander durchgeführten mikrofluorimetrischen Untersuchungen schein-inkubierter B-Zellen (Diagramm (A)) und Fura-2-inkubierter B-Zellen (Diagramm (B)) des Pankreas sind in der schematischen Abbildung 4.2.2 dargestellt. Die Dissoziation zwischen der artifiziellen Fluoreszenz und der unkorrigierten, in Gegenwart des Indikators Fura-2 emittierten Fluoreszenz - im Folgenden als Bruttofluoreszenz charakterisiert – beruhte auf der Subtraktion der jeweils bei 340 nm und 380 nm angeregten und mit einer Frequenz von 1/min registrierten Fluoreszenzemission der schein-inkubierten B-Zellen von derjenigen, die in Gegenwart der Fura-2-inkubierten Zellen registriert wurde. Aus den korrigierten Fluoreszenzemissionen - definiert als Nettofluoreszenzen „Netto λ_{340} “ bzw. „Netto λ_{380} “ - wurde anschließend die in der Darstellung als „Netto $\lambda_{340}/\lambda_{380}$ “ gekennzeichnete Fura-Nettofluoreszenz-Ratio berechnet. Wie aus dem Schema ersichtlich wird, erforderte ein vollständiger Versuchszyklus die Durchführung von zwei Einzelperfusionen unter identischen Bedingungen. Für die Berechnung repräsentativer Mittelwerte wurden die Resultate aus mindestens drei Versuchszyklen herangezogen, in denen die aus drei unterschiedlichen Präparationen isolierten und primär kultivierten B-Zellen analysiert wurden.

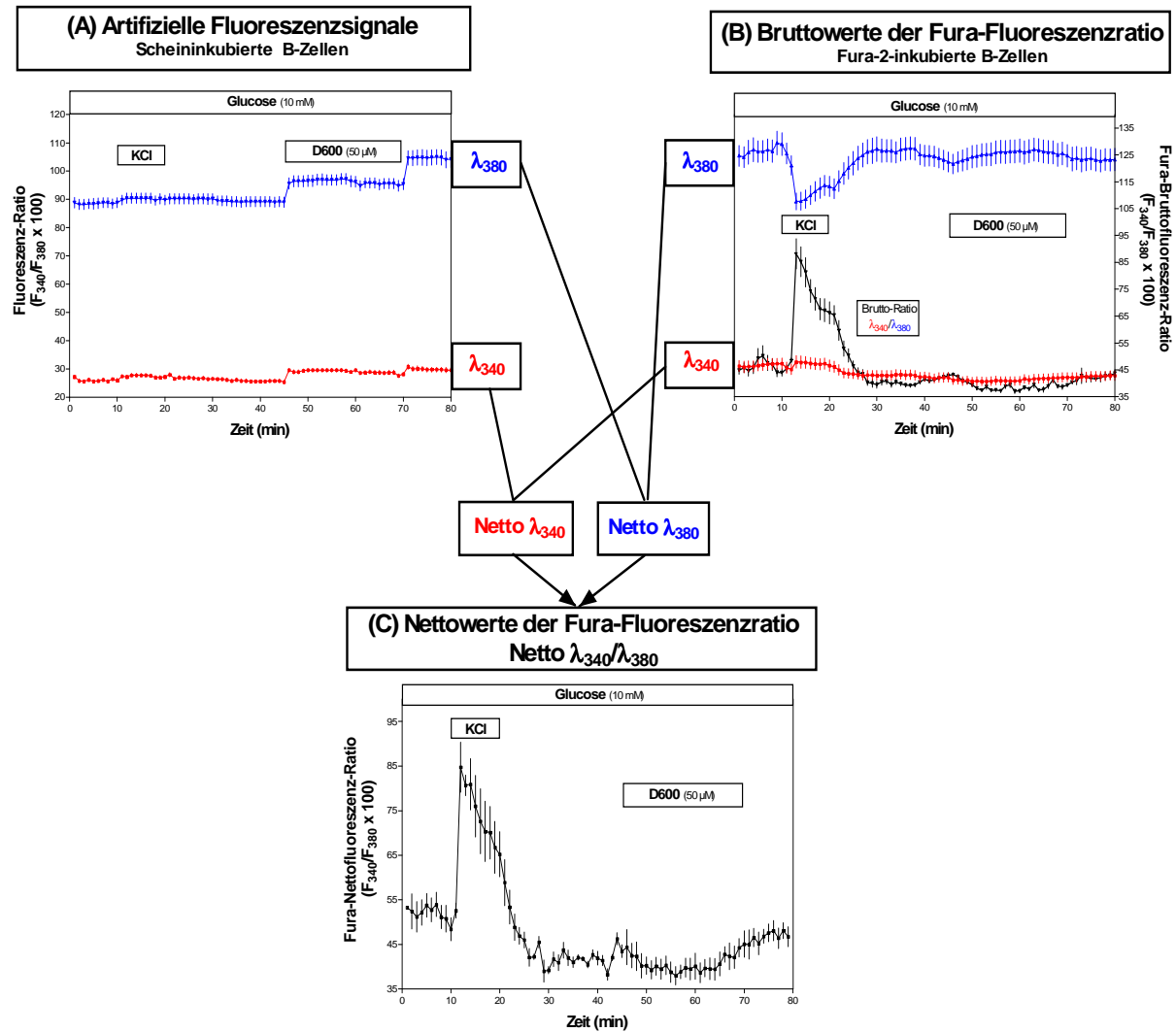


Abbildung 4.2.2 Interferenzen zwischen der Fura-Fluoreszenz-Ratio und den artifiziellen Fluoreszenzsignalen Die Berechnung der Ca^{2+} -regulierten Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (C) basierte der in dem Schema dargestellten Dissoziation zwischen den Autofluoreszenzsignalen (A) der endokrinen B-Zellen, den Komponenten des Mediums und des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten Methoxyverapamil (D600) von der unkorrigierten Fura-Fluoreszenz-Ratio (B), im Folgenden als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio bezeichnet. Zunächst wurde das Ca^{2+} -Signalprofil Fura-2-inkubierter B-Zellen in Gegenwart eines mäßig wirksamen Glucose-Stimulus (10 mM) in Abhängigkeit von der Zeit registriert. Im Anschluss daran erfolgte mit einer Retention von 80 Minuten die Analyse einer adäquaten Anzahl unbelasteter Einzelzellen unter identischen Versuchsbedingungen. Die Berechnung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio erfolgte durch die Subtraktion der jeweils bei 340 nm und 380 nm induzierten Fluoreszenzintensität schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen, die in Gegenwart Fura-2-inkubierter B-Zellen gemessen wurde. Aus den resultierenden positiven Werten der Nettofluoreszenz wurde die Ca^{2+} -abhängige Fura-Nettofluoreszenz-Ratio gebildet. Die dargestellten Ergebnisse der Autofluoreszenzanalyse (A) sowie der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio (B) repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, die während der Perifusion von jeweils sieben schein-inkubierten bzw. Fura-2-inkubierten B-Zellen registriert wurden. Die in (C) dargestellte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio \pm SEM wurde aus den Messergebnissen von drei Versuchszyklen ($n = 22$) berechnet.

Der Vergleich zwischen den Mittelwerten der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.2.2. (C)) und der registrierten Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.2.2. (B)) weist bezüglich des basalen Signalniveaus und der Ansprechbarkeit der isolierten B-Zellen gegenüber einem exogenen K^+ -Stimulus (49,5 mM) in der Kontrollphase von Minute 10 bis Minute 20 keine wesentlichen Unterschiede auf. Das Ausmaß als auch der Verlauf der Signalprofile waren durch vergleichbare Muster gekennzeichnet, wobei die Plateauphase der K^+ -evozierten Depolarisation bei der Bruttofluoreszenz-Ratio intensiver ausgeprägt war.

Hinsichtlich der divergenten Basalwerte und Amplituden der registrierten $[Ca^{2+}]_i$ -Fluktuationen sollte erwähnt werden, dass es sich bei den vorgestellten Bruttowerten der Fura-Fluoreszenz-Ratio lediglich um das Resultat einer Einzelmessung handelt, während sich die Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio bereits auf drei Versuchszyklen beziehen. In diesen wurden insgesamt 22 Fura-2-inkubierte und 22 schein-inkubierte B-Zellen unter Kontrollbedingungen perfundiert. Der Vergleich zwischen den unkorrigierten Bruttowerten einer Einzelmessung und den Ca^{2+} -abhängigen Mittelwerten \pm SEM der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio wurde aus zwei Gründen gewählt:

1) In erster Linie, um die korrigierten Resultate einer vollständigen Versuchssequenz, die mindestens drei Versuchszyklen bzw. sechs Einzelperfusionen umfasste, als Ausdruck für echte Ca^{2+} -Signale vorzustellen.

2) In zweiter Linie, um zu demonstrieren, dass die Signalprofile der Registrierungen durch das angewandte Korrekturprinzip weder in ihrer Qualität noch in der Signalintensität wesentlich beeinflusst wurden.

Da sich die Berechnung der Nettofluoreszenz-Ratio auf ein größeres Versuchskollektiv (sechs Einzelperfusionen, $n = 22$) bezieht, ist die relative Standardabweichung der Mittelwerte in Relation zu den Standardfehlern der Bruttofluoreszenz-Ratio (eine Einzelperfusion, $n = 7$) durch erhöhte \pm SEM-Werte gekennzeichnet.

Die in Gegenwart des Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 bei den Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm angeregte und bei 510 nm registrierte artifizielle Fluoreszenzemission ist in dem Diagramm (A) der Abbildung 4.2.2 dargestellt. Der Verlauf des Kurvenprofils dokumentiert für Methoxyverapamil (D600) eine sehr geringe Fluoreszenzaktivität, so dass signifikante Interferenzen mit der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio auszuschließen sind. Vielmehr verursachte die D600-vermittelte Inhibition eines exogenen Ca^{2+} -Influx die unter diesen Bedingungen zu erwartende Verringerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unterhalb des Basalniveaus (s. Abb. 4.2.2

(B) und (C)). In Relation zu den Bruttowerten der Fluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.2.2. (B)) korrelierte die Analyse einer größeren Anzahl an isolierten B-Zellen (s. Abb. 4.2.2. (C)) mit einer intensiveren Ausprägung des D600-vermittelten Antagonismus. Dementsprechend wurde in Abwesenheit des Inhibitors D600 (Minute 70) auf der Ebene der Nettofluoreszenz-Ratio ein eindeutiger Anstieg des Signalprofils registriert, der im Gegensatz dazu bei der registrierten Bruttofluoreszenz wesentlich geringer ausgeprägt war.

4.2.3 Wirkung ausgewählter Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter Langerhans-Inseln bzw. pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus

Um weitere Aufschlüsse über die Mechanismen zu gewinnen, die für die Insulinsekretions-steigernde Wirkung der Fluorchinolone ursächlich sind, wurde die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen analysiert. Die isolierten und in Primärkulturen auf Deckgläsern gezüchteten B-Zellen wurden mit dem ratiometrischen Fluoreszenzindikator Fura-2 inkubiert und mit den jeweiligen Testmedien perfundiert. In einigen Versuchsprotokollen wurden intakte Langerhans-Inseln unter den gleichen Bedingungen untersucht, so dass die durch Fluorchinolone induzierten Effekte unter verschiedenen Aspekten beurteilt werden konnten.

Zu beantworten war letztlich die Frage, ob diejenigen Fluorchinolone, die sich in vorhergehenden Untersuchungen als effektive Stimulatoren der Insulinsekretion erwiesen hatten, gleichfalls in der Lage sind, die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration mit hoher Potenz zu steigern. Unter mechanistischen Gesichtspunkten galt es aufzuklären, welche Bedeutung die Inaktivierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals für die Steigerung der Insulinsekretion besitzt oder ob andere Mechanismen hinsichtlich der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernden Wirkung in Betracht gezogen werden müssen.

4.2.3.1 Wirkung des Fluorchinolons Lomefloxacin bzw. Norfloxacin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen und Modifizierung des Effektes durch Tolbutamid sowie D600

Nachdem in ratiometrischen Fluoreszenzmessungen sowohl eine durch Lomefloxacin als auch durch Norfloxacin induzierte Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio belegt werden konnte (Kriete, Diplomarbeit 2003), galt es, auf nächster Ebene das Ausmaß dieser Wirkung zu beurteilen.

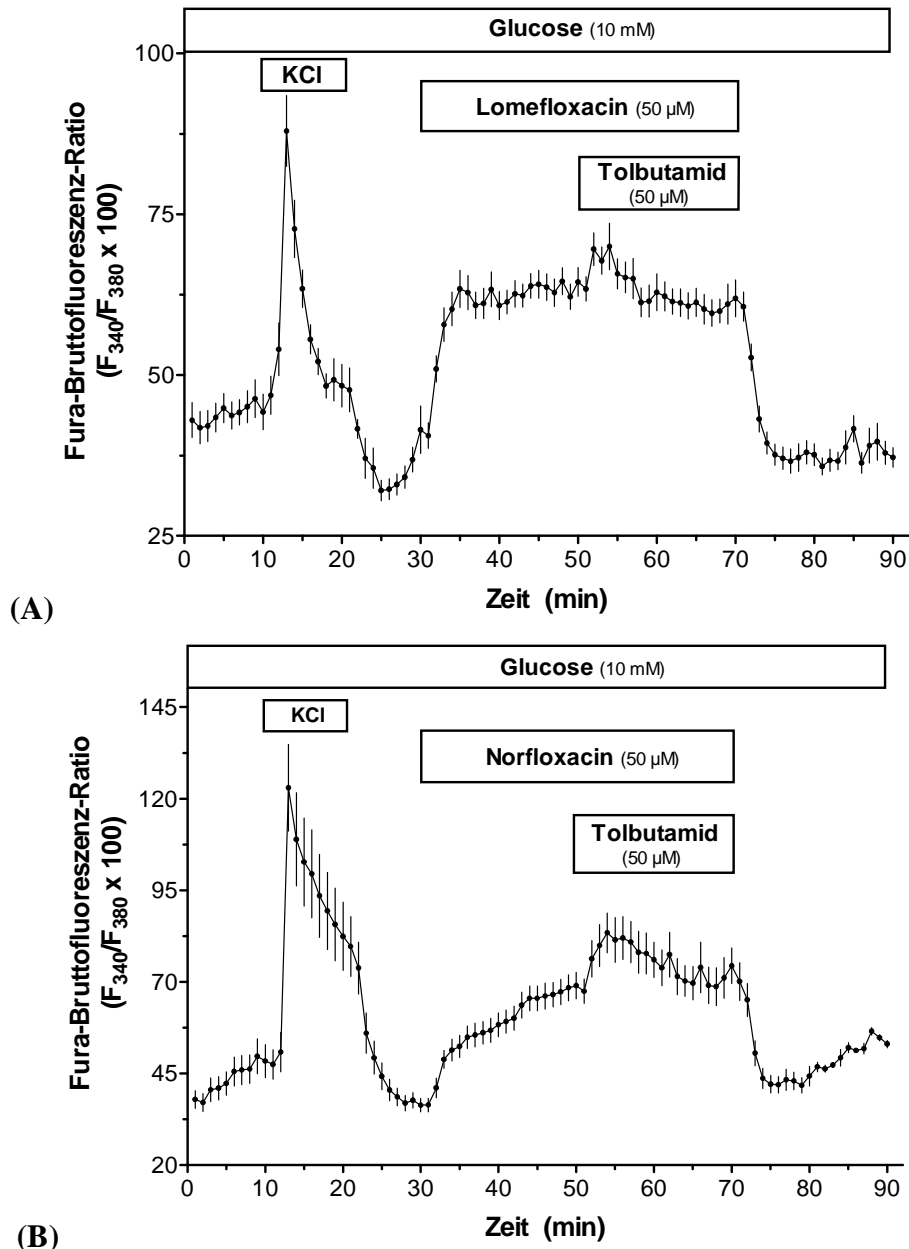


Abbildung 4.2.3.1 Synergistischer Effekt des K_{ATP} -Kanal-Inhibitors Tolbutamid auf die Ca^{2+} -steigernde Potenz der Struktur-Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin

Kultivierte und mit dem Indikator Fura-2 fluorchromierte B-Zellen des Pankreas wurden in Präsenz eines moderaten Glucose-Stimulus mit dem Fluorchinolon Lomefloxacin (A) bzw. Norfloxacin (B) perfundiert. Die Ansprechbarkeit der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf die 40-minütige Fluorchinolon-Exposition wurde als Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert. Die amplifizierende Wirkung des selektiven K_{ATP} -Kanal-Antagonisten, einem Indiz für die Beteiligung divergenter $[Ca^{2+}]_i$ -stimulierender Signalmechanismen, wurde in Gegenwart des jeweiligen Fluorchinolons von Minute 50 bis Minute 70 analysiert. Während des gesamten Versuchsintervalls, das 90 Minuten umfasste, befand sich ein moderater Glucose-Stimulus von 10 mM in dem Medium. Die dargestellten Mittelwerte \pm SEM wurden jeweils aus drei mikrofluorimetrischen Perfusionen berechnet und repräsentieren die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration von 14 (A) bzw. 17 (B) endokrinen B-Zellen, die nach dem konventionellen Collagenase-Digestions-Verfahren aus dem exokrinen Gewebe von drei verschiedenen Präparationen isoliert wurden.

Die Konzentration der Fluorchinolone wurde auf 50 μM determiniert, die gemäß den von Zünkler und Wos (2003) ermittelten IC_{50} -Werten nicht zu einer vollständigen Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals führt.

Unter der Annahme, dass die Fluorchinolon-induzierte Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio nicht ausschließlich auf die Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zurückzuführen war, wurden die isolierten B-Zellen zusätzlich mit 50 μM Tolbutamid perfundiert. Dieses Protokoll diente der Prüfung auf additive bzw. synergistische Effekte, die eine zusätzliche Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verursachen und somit diese Vermutung bestätigen würden. Es zeigte sich, dass 50 μM Tolbutamid in Gegenwart von Norfloxacin zu einem intensiven Anstieg führte, während die gleichzeitige Exposition mit Lomefloxacin und Tolbutamid lediglich einen transienten und deutlich schwächer ausgeprägter Effekt hervorrief (s. Abb. 4.2.3.1). Insofern konnte für Lomefloxacin eine sättigende Wirkung des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -steigernden Wirkungsmechanismus angenommen werden.

Bei der Beurteilung war allerdings das unterschiedliche Ausmaß der durch eine maximale K^{+} -Konzentration induzierte Depolarisation zu berücksichtigen, die bei diesem Versuchsprotokoll als innerer Standard diente. Die K^{+} -Depolarisation war im Gegensatz zu den Versuchen, in denen Norfloxacin analysiert wurde, bei Lomefloxacin von deutlich geringerer Intensität (s. Abb. 4.2.3.1), wodurch die Vergleichbarkeit erschwert wurde. In der Konsequenz erwies sich dieses Versuchsprotokoll als ungeeignet, um eine relevante Wirkung des Fluorchinolons Norfloxacin gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu bestätigen. Zudem blieb ungeklärt, ob Lomefloxacin in der gewählten Konzentration von 50 μM bereits maximal effektiv war, um über die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals eine Stimulation der pankreatischen B-Zellen hervorzurufen.

4.2.3.2 Wirkung des Fluorchinolons C2 bzw. Lomefloxacin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter Langerhans-Inseln

Um das Ausmaß der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -stimulierenden Wirkung der Fluorchinolone trotz der intrinsischen Fluoreszenzaktivität mit Hilfe der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie zu analysieren, wurde ein selektiver Antagonist des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, Methoxyverapamil (D600), eingesetzt. Dieser wurde nach der Stabilisierung des Fluorchinolon-induzierten Effektes auf einem *steady state*, der sich in der Regel innerhalb eines Zeitintervalls von 20 Minuten einstellte, dem Medium in einer maximal inhibitorischen Konzentration von 50 μM zugesetzt.

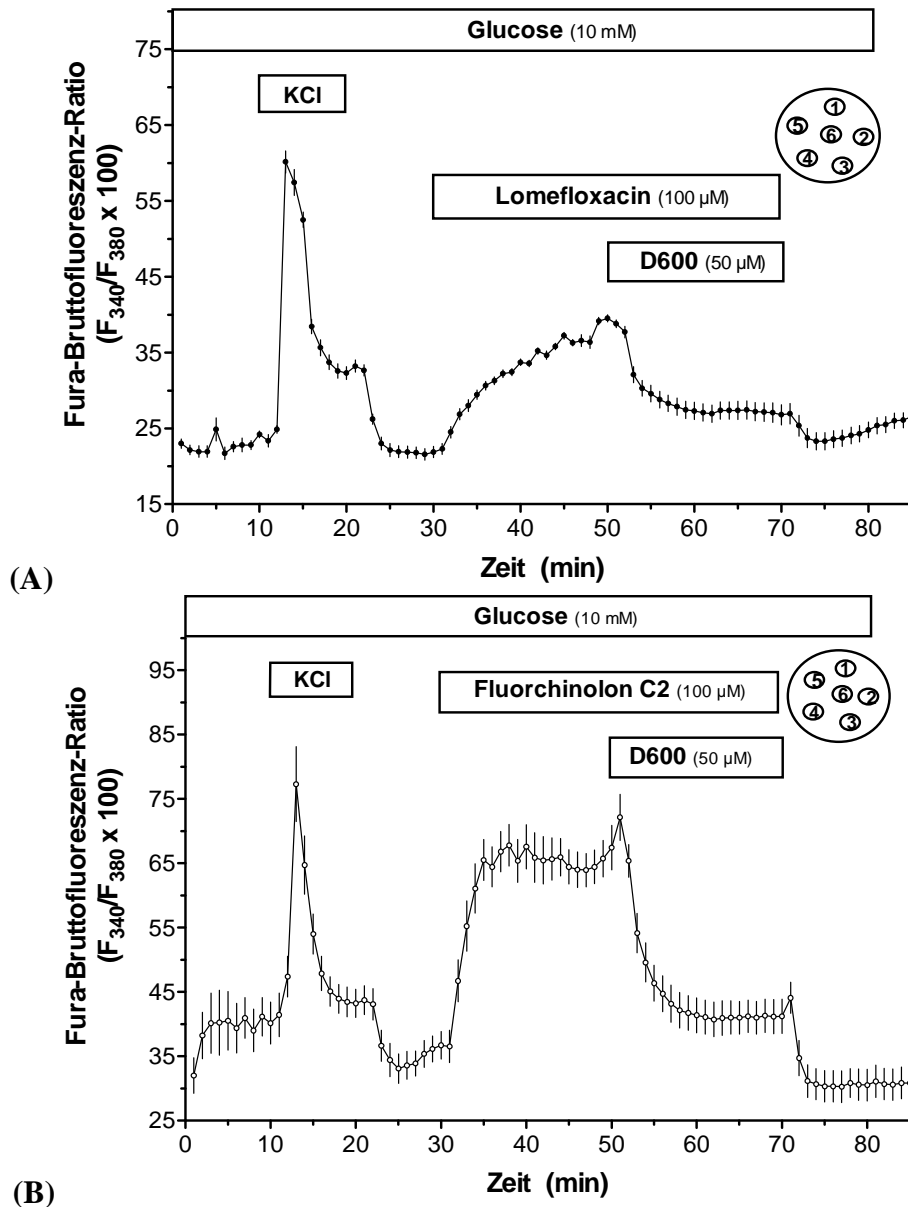


Abbildung 4.2.3.2 Reaktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration isolierter Langerhans-Inseln auf die Exposition mit dem Fluorchinolon Lomefloxacin (A) bzw. C2 (B) Die während eines Zeitintervalls von 18 Stunden kultivierten solitären Langerhans-Inseln wurden in einem Zeitraum von 45 Minuten mit dem Fluoreszenz-indikator Fura-2 inkubiert. Während der gesamten Versuchsdauer von 85 Minuten befand sich eine Glucose-Konzentration von 10 mM in dem Krebs-Ringer-Basismedium. Die funktionelle Integrität der Inseln wurde in einer initialen Prüfphase von Minute 10 bis Minute 20 durch die charakteristische Reaktion auf einem maximal depolarisierenden K^+ -Stimulus nachgewiesen. Nach einer zehnmütigen Äquilibrationsphase folgte ab Minute 30 bis Minute 70 die Exposition mit dem Fluorchinolon Lomefloxacin (A) bzw. C2 (B). Um die Beteiligung exogener Ca^{2+} -Ionen pharmakologisch zu untersuchen, wurde das Perifusionsmedium von Minute 50 bis Minute 70 zusätzlich mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 substituiert. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde als Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert. Die dargestellten Mittelwerte \pm SEM basieren auf der Analyse von jeweils drei Langerhans-Inseln, auf deren Oberfläche sechs regions of interest (ROI 1 bis 6) definiert und kinetisch ausgewertet wurden.

Grundlegend für diese Versuchsanordnung war der Konsensus über die Stimulus-Sekretions-Kopplung. Demzufolge ist die Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals, die nachfolgende Depolarisation der Plasmamembran und den dadurch bedingten Influx exogener Ca^{2+} -Ionen über spannungsabhängige L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zurückzuführen (Ashcroft und Rorsman, 1990). Entsprechend dieser allgemein akzeptierten Vorstellung müsste durch die Hemmung des exogenen Ca^{2+} -Einstroms die Ca^{2+} -vermittelte Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio von der endogenen Fluoreszenz der Fluorchinolone differenziert werden können. Wie in Abbildung 4.2.3.2 dargestellt, wurde tatsächlich infolge der D600-Exposition innerhalb von zehn Minuten eine ausgeprägte Reduktion der Fura-Fluoreszenz-Ratio hervorgerufen. Das Ausmaß des Antagonismus wirkte sich bei dem Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 wesentlich effektiver aus als bei dem Fluorchinolon Lomefloxacin. Allerdings war der weitere Verlauf der Fluoreszenz-Ratio in Abwesenheit der Testsubstanzen C2 durch eine weitere intensive Reduktion gekennzeichnet, die bei dem Fluorchinolon Lomefloxacin in einem geringeren Ausmaß in Erscheinung trat.

In Analogie zu den an Einzelzellen durchgeführten Messungen verhinderte auch bei diesem Protokoll das divergente Ausmaß und Muster der K^{+} -Depolarisation eine eindeutige Beurteilung der Wirkungen und Relationen zwischen den induzierten Effekten. Angesichts dieser unbefriedigenden Situation wurde versucht, ein grundsätzliches Korrekturverfahren zu etablieren, um eine sichere Charakterisierung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als Fura-Fluoreszenz-Ratio zu gewährleisten. Das grundlegende Prinzip, auf dem die Dissoziation zwischen der endogenen Fluoreszenz und der Ca^{2+} -regulierten Fura-Fluoreszenz-Ratio basierte, ist in dem Kapitel 3.5.6 erläutert.

4.2.4 Modulatorische Wirkung therapeutisch relevanter N1-Ethyl- und N1-Cyclopropyl-Fluorchinolone gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration endokriner B-Zellen der NMRI-Albinomaus

In den folgenden Unterkapiteln 4.2.4.1 bis 4.2.4.5 werden die Ergebnisse der stimulatorischen Wirkung klinisch relevanter Fluorchinolone gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration vorgestellt. Dabei handelt es sich im Einzelnen um Lomefloxacin, Norfloxacin, Gatifloxacin sowie Moxifloxacin und Ciprofloxacin. Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration der endokrinen B-Zellen wurde als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio bzw. korrigierte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio charakterisiert und in Relation zu einem maximale depolarisierenden K^{+} -Stimulus als interner Standard quantifiziert. Die Auswertung der registrierten Kinetiken erfolgte nach dem in Kapitel 3.5.6 vorgestellten Korrekturverfahren.

4.2.4.1 Lomefloxacin

Die Exposition der isolierten B-Zellen mit dem Fluorchinolon Lomefloxacin ab Minute 30 induzierte eine deutlich wahrnehmbare Steigerung der Fura-2-Nettofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.2.4.1 (B)) um durchschnittlich 12 Ratio-Einheiten. Der maximale mit 100 μM Lomefloxacin erzielbare Effekt unterschritt das Ausmaß der K^+ -evozierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration um zehn Einheiten und erforderte einen Zeitraum von sieben Minuten. Im Anschluss an eine geringgradige Reduktion der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio stabilisierte sich die Fluoreszenz-Ratio auf einem konstanten Niveau von 59 Einheiten, das während der gesamten Expositionsphase aufrechterhalten wurde.

Um die Beteiligung eines exogenen Ca^{2+} -Einstroms an dem Fluorchinolon-induzierten Mechanismus pharmakologisch nachzuweisen, befand sich Methoxyverapamil (D600), ein selektiver Antagonist des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, von Minute 45 bis Minute 70 in dem Perifusionsmedium. Dieser verursachte nach einer Latenz von zwei Minuten die Reduktion der Netto-Fluoreszenz-Ratio auf das prästimulatorische Basisniveau, das einem Wert von 45 Einheiten entsprach. Für die vollständige Aufhebung der Fluorchinolon-induzierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration war eine neunminütige D600-Exposition erforderlich.

Die Beendigung der Perifusion mit der Testsubstanz (Minute 60) zeigte keinen Einfluss auf die Intensität der Nettofluoreszenz-Ratio, die weiterhin auf dem basalen Niveau sistierte. Die in dem Diagramm (B) dargestellten Daten der Nettofluoreszenz-Ratio deuten weder auf einen Verlust noch auf eine Potenzierung des D600-vermittelten Antagonismus durch Lomefloxacin hin. Nach Beendigung der Exposition mit dem Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 war der weitere Verlauf der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio durch eine gering steigende Tendenz gekennzeichnet. Als Konsequenz befand sich die Fluoreszenz-Ratio in Abwesenheit sowohl des Fluorchinolons als auch des Antagonisten D600 in dem Bereich prästimulatorischen Werte, die in der initialen Versuchsphase registriert wurden.

Die Präsenz eines maximal stimulierenden K^+ -Konzentration von 49,5 mM in dem Krebs-Ringer-Basismedium (Minute 10 bis Minute 20) verursachte innerhalb von zwei Minuten einen intensiven Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf einem maximalen Wert von 75 Ratio-Einheiten. Sowohl bei der Nettofluoreszenz als auch bei der Bruttofluoreszenz wurde ein gleichartiges Muster dieser K^+ -evozierten Depolarisation registriert. Die Fluoreszenz-Ratio wies bereits in der nächsten Minute eine absteigende Tendenz auf, um sich bei Minute 15 einem *steady state*-Zustand anzunähern.

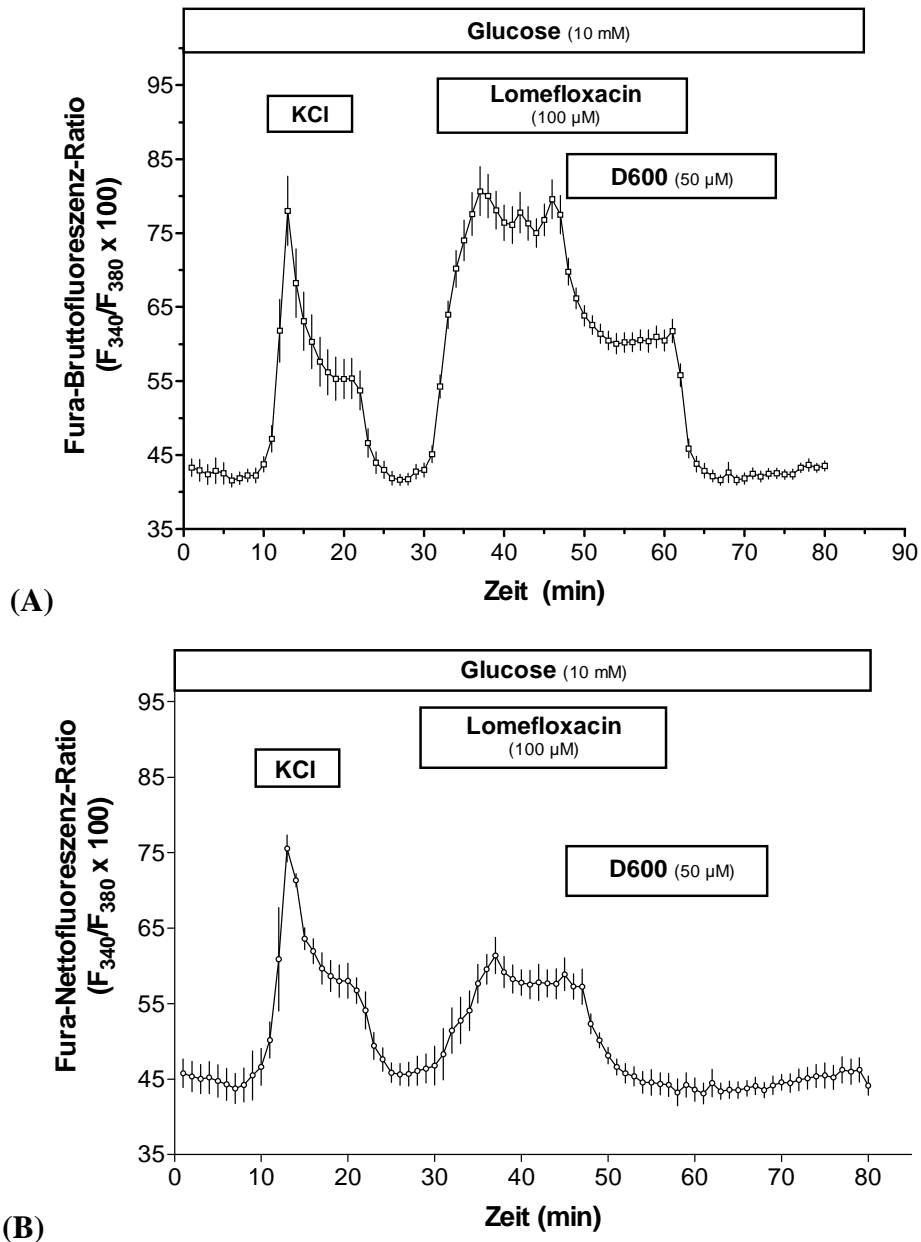


Abbildung 4.2.4.1 Wirkung des Fluorchinolons Lomefloxacin gegenüber der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus Die in (A) dargestellten Messwerte repräsentieren die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio (= Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio). Die Ergebnisse der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio sind in (B) abgebildet und wurden durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen Fura-2-inkubierter B-Zellen berechnet (s. Kap.3.5.6). Während der gesamten Versuchsphase enthielt das Krebs-Ringer-Basismedium eine Konzentration von 10 mM Glucose. Um die funktionelle Integrität der isolierten B-Zellen des Pankreas zu beurteilen, erfolgte von Minute 10 bis Minute 20 die Stimulation mit einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration von 49,5 mM. Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perfusion mit 100 μM Lomefloxacin fortgesetzt, wobei sich ab Minute 45 bis Minute 70 zusätzlich der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist D600 in dem Medium befand. Die Mittelwerte der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio \pm SEM wurden durch die Analyse von 19 Fura-2-inkubierten B-Zellen in drei Versuchen berechnet. Die Berechnung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio \pm SEM (B) basierte auf fünf Versuchszyklen, in denen insgesamt 24 Fura-2-inkubierte bzw. schein-inkubierte B-Zellen perfundiert wurden.

Die Beendigung der K^+ -induzierten Depolarisation der endokrinen B-Zellen (Minute 20) äußerte sich sowohl bei der Brutto- als auch bei der Nettofluoreszenz-Ratio durch die Wiederherstellung der ursprünglichen $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration.

In Relation zu den B-Zellen, die durch direkte Injektion der Collagenase in den *Ductus choledochus* isoliert wurden, zeigte sich bei diesen Experimenten das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau der mit 10 mM Glucose stimulierten B-Zellen auffällig gleichförmig. Oszillationen der Fura-Fluoreszenz-Ratio konnten ungeachtet der Glucose-induzierten moderaten Aktivierung des Zell-Metabolismus nicht registriert werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass aufgrund der Phasenverschiebung und der Mittelwertbildung $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in einer Population von Einzelzellen schwer darstellbar sind. Insbesondere bei den B-Zellen, die durch das konventionelle Collagenase-Digestions-Verfahren aus dem exokrinen Pankreas isoliert wurden, traten weder Oszillationen noch Fluktuationen in Erscheinung. Demgemäß waren die registrierten Nettowerte als auch die Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio durch vergleichbare Kinetiken sowohl der Glucose-initiierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch des D600-Effektes gekennzeichnet.

Wurde keine Nettofluoreszenz-Ratio gebildet, so verursachte Lomefloxacin eine zusätzliche Steigerung der Fluoreszenz-Ratio um 17 Einheiten (s. Abb. 4.2.4.1 (A)). Diese Signal-Komponente zeigte sich resistent gegenüber der Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600. Der Vergleich der Nettofluoreszenz mit den Daten der Bruttofluoreszenz verdeutlicht einen Intensitätsverlust des D600-vermittelten Antagonismus um fünf Ratio-Einheiten, der auf das Korrekturverfahren zurückzuführen ist. Die relative Standardabweichung wurde demgegenüber nur geringfügig erhöht.

4.2.4.2 Norfloxacin

Die in dem Diagramm (B) dargestellten Ergebnisse der Nettofluoreszenz-Ratio lassen einen marginalen Anstieg der Fura-2-Nettofluoreszenz-Ratio um ungefähr fünf Ratio-Einheiten erkennen, der nach einer Verzögerung von drei Minuten durch das Fluorchinolon Norfloxacin (Minute 30) induziert wurde. Der während der Exposition mit 100 μ M Norfloxacin erzielbare Effekt war wesentlich geringer ausgeprägt als die Plateauphase der K^+ -evozierten Depolarisation (Minute 10 bis Minute 20). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio blieb jedoch bis zu dem Beginn der Exposition mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 auf diesem Niveau konstant erhöht.

Methoxyverapamil (D600), das sich von Minute 45 bis Minute 70 zusätzlich in dem Krebs-Ringer-Basismedium befand, verursachte nach einer Latenz von zwei Minuten eine

Suppression der Nettofluoreszenz-Ratio auf das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau. Auffallend an dem D600-induzierten Effekt war die ebenso ausgeprägte Reduktion der registrierten SEM-Werte, einem Ausdruck für die unvermindert anhaltende inhibitorische Potenz des Antagonisten gegenüber dem Einstrom exogener Ca^{2+} -Ionen. Die Beendigung der Perifusion mit dem Fluorchinolon manifestierte sich durch einen erneuten, deutlich ausgeprägten Anstieg der Fura-Ratio, wobei dieser Prozess mit einer Erhöhung des relativen Standardfehlers korrelierte. In Abwesenheit der Testsubstanz sowie des Antagonisten D600 (Minute 70 bis Minute 80) stabilisierte sich die Ratio auf einem konstanten Niveau, das im Mittelwert drei Einheiten oberhalb der initialen Fura-Nettofluoreszenz-Ratio lokalisiert war.

Die Exposition der kultivierten B-Zellen mit einer maximal depolarisierend wirkenden K^+ -Konzentration von 49,5 mM (Minute 10 bis Minute 20) induzierte innerhalb weniger Minuten einen prompten Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf einen maximalen Wert von 75 Einheiten (Bruttofluoreszenz) bzw. 70 Einheiten (Nettofluoreszenz). Dieses für pankreatische B-Zellen charakteristische Signalprofil der K^+ -Depolarisation wurden durch das Korrekturverfahren nicht beeinträchtigt. Die Beendigung der K^+ -Exposition (Minute 20) äußerte sich auf der Ebene der Bruttofluoreszenz - in etwas geringerem Ausmaß ebenso bei der Nettofluoreszenz – durch die Nivellierung der Ratio auf den prästimulatorischen Bereich.

Oszillationen der Fura-Fluoreszenz-Ratio stellten sich während der gesamten Perifusionsphase mit einer Glucose-Konzentration von 10 mM nicht dar. Darauf basierend waren die Nettowerte als auch die Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio durch vergleichbare Kinetiken der Glucose-initiierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie des D600-vermittelten Antagonismus charakterisiert.

Wurde aus der registrierten Bruttofluoreszenz-Ratio nicht die korrespondierende Nettofluoreszenz-Ratio berechnet, verursachte die endogene Fluoreszenzemission der Testsubstanz Norfloxacin eine zusätzliche Steigerung der Signalintensität um ungefähr 20 Einheiten (s. Abb. 4.2.4.2 (A)). Um den gleichen Betrag wurde das Ausmaß der Bruttofluoreszenz-Ratio reduziert, sobald das Fluorchinolon in Gegenwart von D600 aus dem Perifusionssystem ausgewaschen wurde.

Der D600-induzierte Antagonismus trat bei der korrigierten Nettofluoreszenz-Ratio mit einer geringeren Effizienz in Erscheinung, so dass eine Reduktion der Fluorchinolon-initiierten Ratio-Steigerung um lediglich acht Einheiten resultierte. Als Konsequenz der Dissoziation zwischen der endogenen Fluoreszenz und der Fura-2-basierenden Fluoreszenzemission wurde der Standardfehler der Nettofluoreszenz-Ratio moderat erhöht.

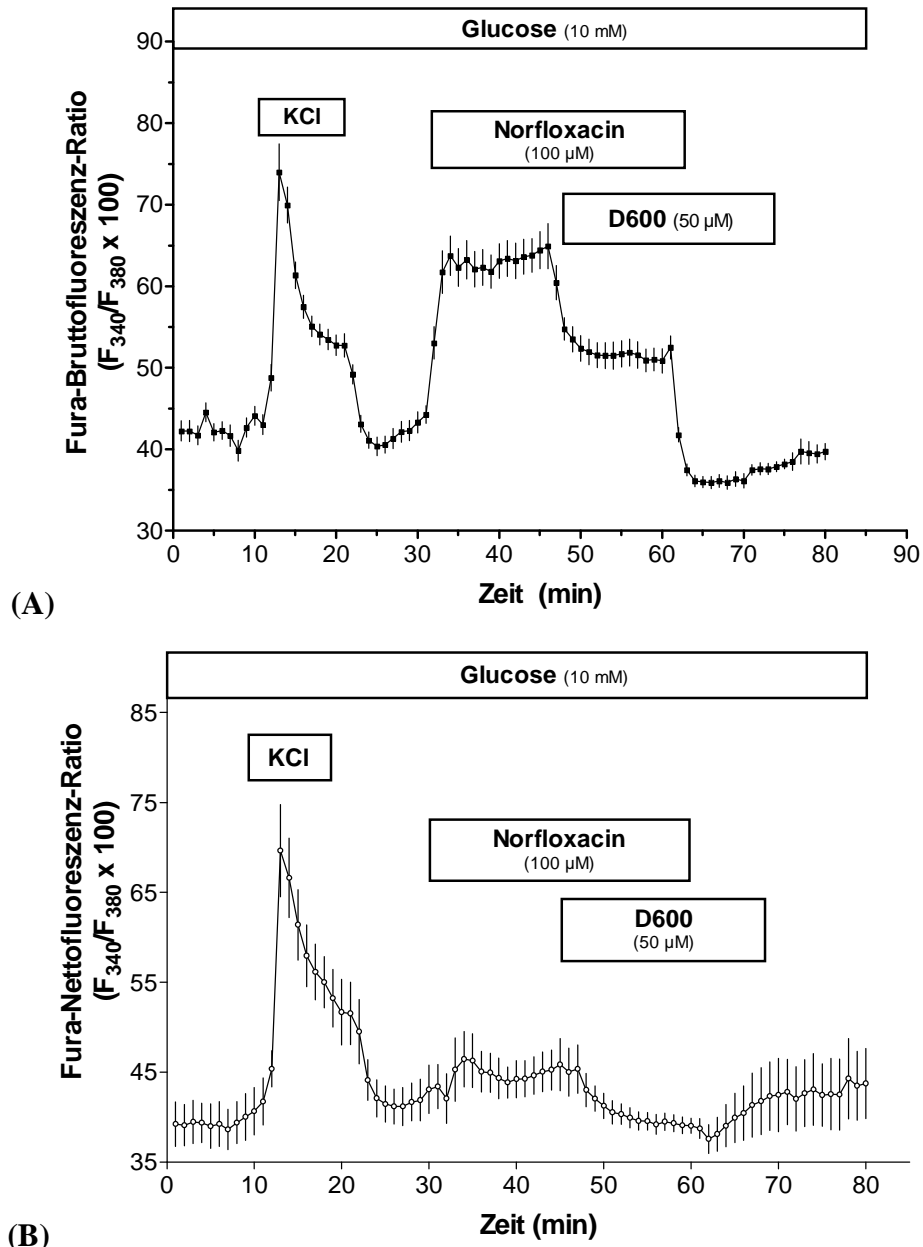


Abbildung 4.2.4.2 Effekt des Fluorchinolons Norfloxacin auf die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus Die in (A) dargestellten Messwerte repräsentieren die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio. Die in (B) dargestellten Werte stellen die korrigierte Nettofluoreszenz-Ratio dar. Diese wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenz-emission schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen Fura-2-inkubierter B-Zellen errechnet (s. Kap.3.5.6). Die funktionelle Integrität der isolierten B-Zellen des Pankreas wurde von Minute 10 bis Minute 20 durch die charakteristische Ansprechbarkeit gegenüber einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration nachgewiesen. Während der gesamten Messung wurde der Zell-Metabolismus durch einen mäßig effektiven Glucose-Stimulus von 10 mM aktiviert. Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perfusion mit 100 μM Norfloxacin durchgeführt, wobei das Medium ab Minute 45 bis Minute 70 zusätzlich mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist D600 substituiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 27 Fura-2-inkubierten und 29 schein-inkubierten B-Zellen, die in vier Einzelperfusionen (A) bzw. sieben Versuchszyklen (B) aus je zwei Einzelperfusionen ermittelt wurden.

Zusammenfassend weisen die Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio dem Fluorchinolon Norfloxacin in einer Konzentration von 100 μM eine marginal ausgeprägte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernde Potenz zu.

4.2.4.3 Gatifloxacin

Das Fluorchinolon Gatifloxacin induzierte in einer Konzentration von 100 μM innerhalb von vier Minuten eine ausgeprägte Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (s. Abb. 4.2.4.3 (B)). Das Ausmaß des Effektes entsprach einer Nettofluoreszenz-Ratio von ungefähr 17 Einheiten. In der darauf folgenden zweiten Phase wirkte sich der Effekt mit einer wesentlich geringeren Effizienz auf die Fluoreszenz-Ratio aus, die während der gesamten, bis Minute 45 andauernden Expositionsphase kontinuierlich um weitere fünf Ratio-Einheiten auf ein Maximum von 68 Einheiten erhöht wurde. Dieses Ausmaß unterschritt die experimentell von Minute 10 bis Minute 20 induzierte K^+ -Depolarisation um eine Ratio von zehn Einheiten.

Die Abhängigkeit des zu Grunde liegenden Wirkungsmechanismus von einem Influx exogener Ca^{2+} -Ionen wurde auch bei diesem Versuchsprotokoll unter Verwendung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 analysiert. Dieser befand sich ab Minute 45 in dem Krebs-Ringer-Basismedium und verursachte nach einer Latenz von einer Minute eine partielle Reduktion der Fluoreszenz-Ratio auf einen konstanten Bereich von 55 Einheiten. Das in Relation zu den basalen Werten weiterhin erhöhte Niveau der Nettofluoreszenz-Ratio, deren Ausmaß unter diesen Bedingungen ungefähr 50 % des ursprünglichen Effektes entsprach, verdeutlichte die geringe Potenz des D600-vermittelten Antagonismus.

Die Beendigung der Fluorchinolon-Exposition verursachte nicht die bei den Fluorchinolonen Lomefloxacin und Norfloxacin beobachtete vollständige Aufhebung des Effektes, sondern führte lediglich zu einer partiellen Reduktion. Auffallend war in diesem Zusammenhang die schnelle Kinetik, mit der die Reduktion dieser D600-resistenten Komponente unterhalb des prästimulatorischen Ausgangsniveaus erfolgte. Dieses Phänomen, das unmittelbar mit dem Auswaschen der Testsubstanz korrelierte, lässt einen artifiziellen Ursprung dieser Signalkomponente vermuten.

In dem weiteren Verlauf der D600-Exposition stabilisierte sich die Nettofluoreszenz-Ratio auf den Bereich der ursprünglichen Basalwerte, die in Abwesenheit des Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 (Minute 70) weder reduziert noch in ihrer Intensität erhöht wurden. Demgemäß sistierte die Fluoreszenz-Ratio in der terminalen Versuchsphase, in der die B-

Zellen ausschließlich mit dem Krebs-Ringer-Medium perfundiert wurden, auf dem prästimulatorischen Niveau – entsprechend einer Nettofluoreszenz-Ration von 47 Einheiten.

Die Stimulation der kultivierten B-Zellen mit einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration von 49,5 mM rief die für funktionell intakte und elektrisch aktivierbare B-Zellen charakteristische effektive Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio hervor. Der maximale Effekt der K^+ -initiierten Depolarisation manifestierte sich bereits in der nächsten Minute und entsprach einer Bruttofluoreszenz-Ratio von 91 Einheiten bzw. einer Nettofluoreszenz-Ratio von 79 Einheiten. Der Vergleich der in den Diagrammen (A) und (B) dargestellten Versuchsdaten dokumentiert, dass sowohl bei der Nettofluoreszenz als auch bei der Bruttofluoreszenz adäquate Muster des K^+ -evozierten $[Ca^{2+}]_i$ -Signals hervorgerufen wurden. Der weitere Verlauf des Signalprofils war bereits in der nächsten Minute durch eine absteigende Tendenz gekennzeichnet, um sich bei Minute 15 einem *steady state*-Zustand anzunähern. Das Aussetzen des exogenen K^+ -Stimulus erfolgte bei Minute 20 und äußerte sich durch die Stabilisierung der Fluoreszenz-Ratio auf prästimulatorische Werte.

In Relation zu den B-Zellen, die durch direkte Injektion der Collagenase in den *Ductus choledochus* isoliert wurden, zeigte sich bei den konventionell isolierten Zellen - wie bereits bei dem Fluorchinolone Lomefloxacin beschrieben - unter Basalbedingungen ein relativ gleichförmiges $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau. Ungeachtet der Glucose-induzierten (10 mM) Stimulation der pankreatischen B-Zellen, traten weder Oszillationen noch Fluktuationen während der gesamten Perifusionsmessung in Erscheinung. Als Konsequenz wiesen sowohl die Nettowerte als auch die Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio vergleichbare Kinetiken auf. Diese Konformität zeigte sich im Einzelnen auf der Ebene der Glucose-induzierten Stimulation, der Gatifloxacin-initiierten $[Ca^{2+}]_i$ -Steigerung und des D600-vermittelten Antagonismus.

Wurde die endogene Fluoreszenz des Fluorchinolons nicht von der Fura-Bruttofluoreszenz durch die Berechnung der entsprechenden Nettofluoreszenz dissoziiert, so verursachte Gatifloxacin eine ausgeprägte Steigerung der Fluoreszenz-Ratio um weitere 60 Einheiten (s. Abb. 4.2.4.3 (A)). Dieser Effekt konnte durch die Exposition mit dem Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor D600 lediglich partiell aufgehoben werden.

Das Korrekturverfahren zeigte keinen Einfluss auf das Ausmaß und die Qualität des D600-vermittelten Antagonismus, der mit adäquater Potenz eine Reduktion der Fura-Fluoreszenz-Ratio um 18 Einheiten bewirkte. Ebenso konstant verhielten sich die relativen Standardabweichungen \pm SEM der registrierten Ratio-Werte.

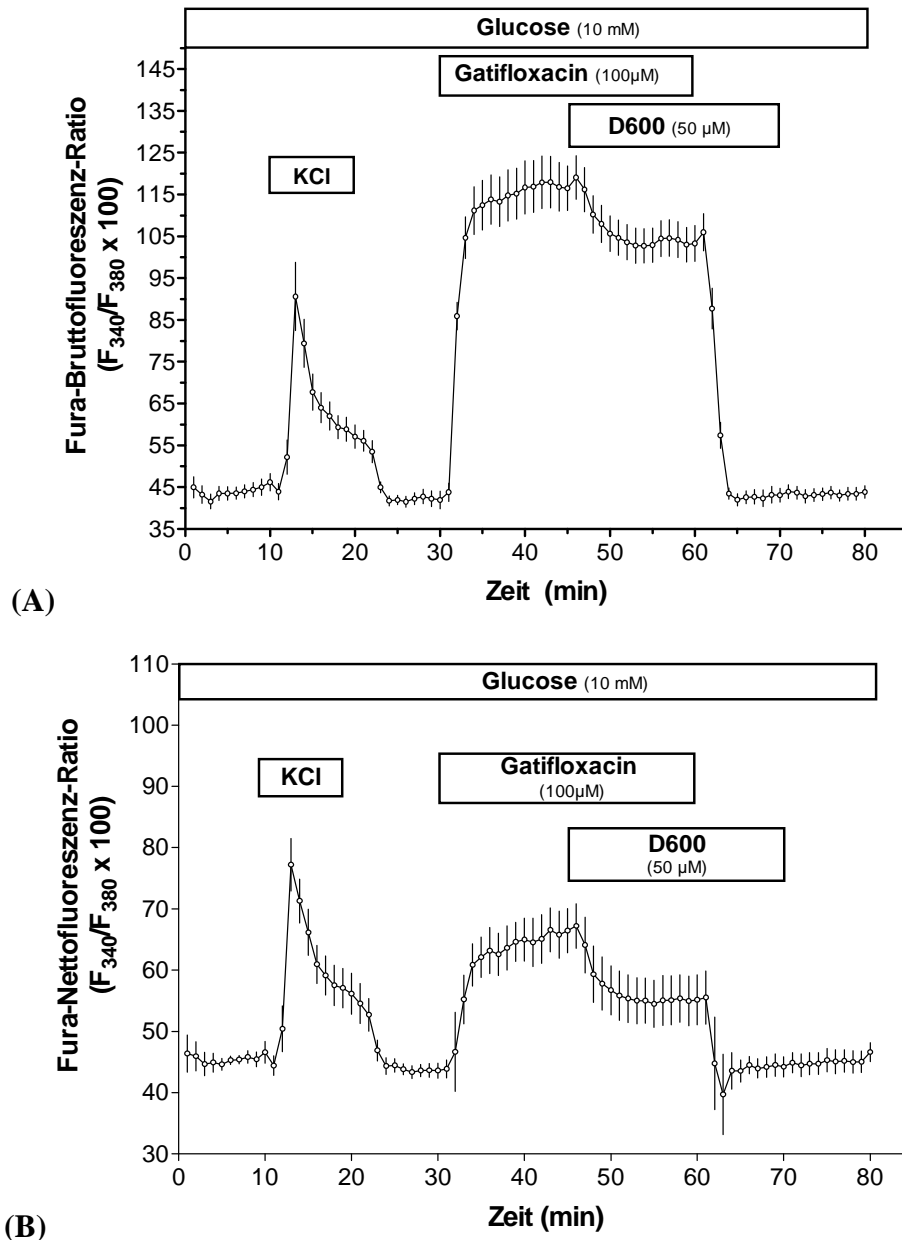


Abbildung 4.2.4.3 Reaktion der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus gegenüber dem Fluorchinolon Gatifloxacin Die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, wird durch die in (A) dargestellten Daten repräsentiert. Die in (B) vorgestellten Ergebnisse repräsentieren die korrigierte Nettofluoreszenz-Ratio, die durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von der Emission Fura-2-inkubierter B-Zellen berechnet wurde (siehe Kap.3.5.6). Das Krebs-Ringer-Basismedium enthielt während der gesamten Perifusion einen moderaten Glucose-Stimulus von 10 mM. Sowohl die funktionelle Integrität als auch die elektrische Aktivität der primär kultivierten B-Zellen wurde von Minute 10 bis Minute 20 durch die charakteristische Ansprechbarkeit auf eine maximal depolarisierende K^+ -Konzentration von 49,5 mM nachgewiesen. Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perifusion mit 100 μ M Gatifloxacin durchgeführt, wobei das Medium ab Minute 45 bis Minute 70 zusätzlich mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist D600 substituiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 25 Fura-2-inkubierten und 26 schein-inkubierten B-Zellen, die in vier Einzelperifusionen (A) bzw. sechs Versuchszyklen (B) ermittelt wurden.

4.2.4.4 Moxifloxacin

Die Exposition der kultivierten B-Zellen des Pankreas mit 100 μM des Fluorchinolons Moxifloxacin verursachte in Gegenwart einer Glucose-Konzentration von 10 mM einen ausgeprägten Anstieg der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (Diagramm (B)) auf ein Maximum von 70 Einheiten. In Relation zu dem internen Standard befand sich das Niveau der gesteigerten Ca^{2+} -Konzentration oberhalb der Plateauphase der K^{+} -induzierten Depolarisation. Hinsichtlich der Kinetik des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernden Wirkungsmechanismus setzte der Ratio-Anstieg nach einer Latenz von einer Minute ein und erreichte innerhalb von zwei Minuten das maximale Ausmaß (Minute 34). Bereits in der nächsten Minute zeigte der weitere Verlauf der Fluoreszenz-Ratio eine kontinuierliche Verringerung, um nach einer Exposition von insgesamt zehn Minuten auf einem konstanten Niveau (62 Einheiten) zu sistieren. Das Fortsetzen der Zell-Perifusion mit dem Fluorchinolon führte zu einem erneuten Anstieg der Fluoreszenz-Ratio, deren weiterer Verlauf durch die Anwesenheit des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 (Minute 45) unterbrochen wurde.

Die Beteiligung eines über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-vermittelten Influx exogener Ca^{2+} -Ionen an dem Wirkungsmechanismus wurde durch die Exposition der pankreatischen B-Zellen mit D600 von Minute 45 bis Minute 70 beurteilt. Der D600-induzierte Antagonismus manifestierte sich nach einer Latenz von zwei Minuten durch die partielle Reduktion der Nettofluoreszenz-Ratio um zehn Einheiten. Als Konsequenz dieser moderaten Wirkung blieb der überwiegende Anteil des Effektes – entsprechend einer Ratio von 55 Einheiten – erhalten. In Relation zu dem Fluorchinolon Gatifloxacin (s. Abb. 4.2.4.3) umfasste das Ausmaß dieser D600-resistenten Komponente ebenfalls ungefähr 50 % der induzierten Steigerung der Nettofluoreszenz-Ratio. Die auffallend prompte Suppression dieser Signalkomponente korrelierte auch unter diesen Bedingungen unmittelbar mit der Beendigung der Fluorchinolon-Perifusion bei Minute 60.

In dem weiteren Verlauf der D600-Exposition stabilisierte sich die Fluoreszenz-Ratio auf das prästimulatorische Basisniveau, das auch nach Beendigung der D600-Perifusion (Minute 70) weiterhin aufrechterhalten wurde. Dementsprechend lagen in der terminalen Perifusionsphase von Minute 70 bis Minute 80, in der die B-Zellen ausschließlich mit dem Glucose-haltigen Krebs-Ringer-Medium perfundiert wurden, die basalen bzw. prästimulatorischen Verhältnisse vor. Dieser Sachverhalt belegt die vollständige Reversibilität der in Gegenwart des Fluorchinolons registrierten Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio.

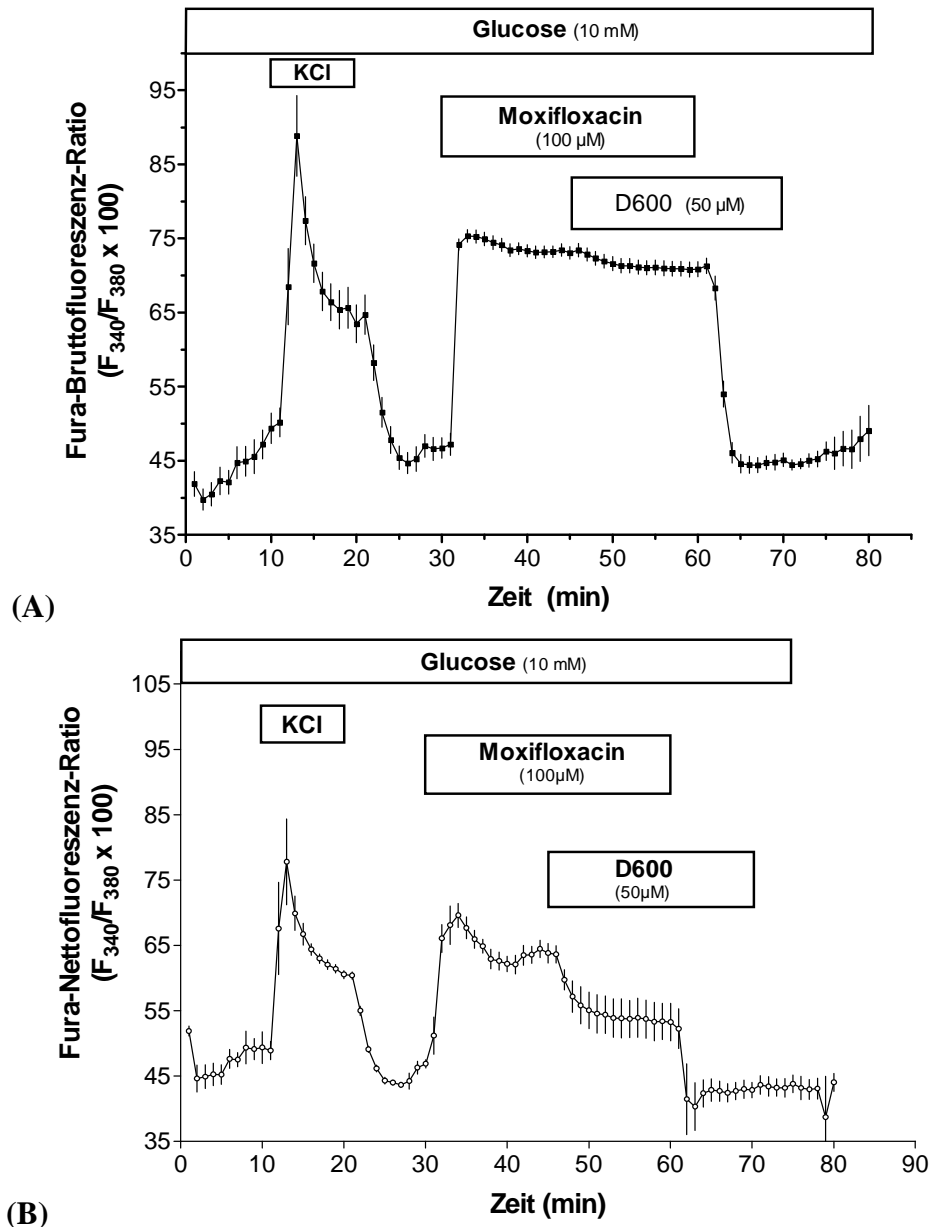


Abbildung 4.2.4.4 Ca^{2+} -steigernde Wirkung des Fluorchinolons Moxifloxacin auf die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen der Langerhans-Inseln wurde als Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Zeit charakterisiert. Die in (A) dokumentierten Messwerte repräsentieren die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio. Die korrigierte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio, dargestellt in (B), wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen Fura-2-inkubierter B-Zellen berechnet (siehe Kap.3.5.6). Die funktionelle Integrität der isolierten B-Zellen des Pankreas wurde von Minute 10 bis Minute 20 durch die Exposition mit einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration nachgewiesen. Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perifusion mit 100 μM Gatifloxacin durchgeführt, wobei das Medium ab Minute 45 bis Minute 70 zusätzlich mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist D600 versetzt wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 28 Fura-2-inkubierten und 29 schein-inkubierten B-Zellen, die in sieben Versuchszyklen aus je zwei Einzelexperimenten (B) ermittelt wurden. Die Bruttowerte \pm SEM (A) repräsentieren die Resultate von vier Einzelmessungen bzw. 25 B-Zellen.

Die Stimulation der kultivierten B-Zellen des Pankreas mit einer exogenen K^+ -Konzentration von 49,5 mM über einen Zeitraum von zehn Minuten initiierte eine intensive Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio. Das maximale Ausmaß der Depolarisation (Minute 13) entsprach einer Bruttofluoreszenz-Ratio von 99 Einheiten bzw. einer Nettofluoreszenz-Ratio von 78 Einheiten. Sowohl bei den Nettowerten als auch bei den Bruttowerten der Fura-Fluoreszenz-Ratio wurden vergleichbare $[Ca^{2+}]_i$ -Signalmuster während der K^+ -induzierten Depolarisation registriert, die mit vergleichbarer Kinetik in Erscheinung traten. Das Aussetzen des exogenen K^+ -Stimulus bei Minute 20 äußerte sich in der nachfolgenden Perifusionsphase durch die Wiederherstellung der basalen $[Ca^{2+}]_i$ -Verhältnisse, so dass die Fluoreszenz-Ratio nach einem Zeitraum von sieben Minuten dem prästimulatorischen Basalniveau von 45 Einheiten entsprach.

Die Isolation der endokrinen B-Zellen wurde nach der Methode der direkten Collagenase-Injektion (s. Kap. 3.3.2) durchgeführt. Dementsprechend waren die Zellen durch eine erhöhte Glucose-Sensitivität charakterisiert. Das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau der mit 10 mM Glucose moderat stimulierten Zellen fluktuierte mit einer geringen Amplitude innerhalb eines Intervalls von 47 bis 44 Ratio-Einheiten. Diese Glucose-induzierte mäßig effektive Stimulation des Energie-Metabolismus manifestierte sich sowohl bei der Netto-Ratio als auch der Brutto-Ratio mit einer vergleichbaren Kinetik und Intensität.

Moxifloxacin verursachte in Relation zu der korrigierten Nettofluoreszenz-Ratio eine deutliche Steigerung der Bruttofluoreszenz-Ratio um 28 Einheiten (s. Abb. 4.2.4.4 (A)). Dieser Effekt zeigte sich, wie bereits bei Gatifloxacin beobachtet werden konnte, resistent gegenüber der antagonistischen Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600, dessen Präsenz in dem Medium (Minute 45) eine nicht sicher wahrnehmbare Reduktion der Bruttofluoreszenz-Ratio hervorrief. Hinsichtlich der Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio führte das Korrekturverfahren zu einer Intensivierung der D600-induzierten Reduktion der Ratio um zehn Einheiten, so dass sich die inhibitorische Wirkung wesentlich effizienter darstellte. Gleichzeitig wurde durch die Berechnung der Nettofluoreszenz-Ratio die relative Standardabweichung \pm SEM moderat erhöht.

4.2.4.5 Ciprofloxacin

Das Fluorchinolon Ciprofloxacin induzierte in einer Konzentration von 100 μ M eine effektive Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Der maximale Effekt, der während einer 30 Minuten umfassenden Exposition der pankreatischen B-Zellen mit der Testsubstanz erzielt werden konnte, manifestierte sich nach einem Zeitraum von 15 Minuten und entsprach

einer Fluoreszenz-Ratio von 55 Einheiten (s. Abb. 4.2.4.5 (B)). Das Ausmaß der $[Ca^{2+}]_i$ -steigernden Wirkung erreichte das Niveau der Plateauphase, die sich während der experimentell induzierten K^+ -Depolarisation bei Minute 18 etablierte. In Relation zu dem bereits in Kapitel 4.2.4.3 vorgestellten Fluorchinolon Gatifloxacin war der Wirkungsmechanismus durch eine vergleichbare Kinetik gekennzeichnet: nach einem initialen Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio, folgte eine retentierte zweite Phase, die während der gesamten Expositionsphase mit dem Fluorchinolon eine zusätzliche Erhöhung um zwei Ratio-Einheiten bewirkte.

Die Abhängigkeit des $[Ca^{2+}]_i$ -steigernden Mechanismus von einem über den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal vermittelten Ca^{2+} -Influx wurde durch die Exposition (Minute 45 bis Minute 70) mit dem selektiven Antagonisten D600 analysiert. Dieser verursachte nach einer Verzögerung um eine Minute die vollständige Suppression der Nettofluoreszenz-Ratio unterhalb des prästimulatorischen Basisniveaus. Die langsame Kinetik des Antagonismus erforderte eine Perifusionsphase von sechs Minuten, um das maximale Ausmaß – entsprechend einer Ratio von 44 Einheiten – zu erreichen.

Die Beendigung der Fluorchinolon-Exposition (Minute 60) wirkte sich nicht modifizierend auf die Intensität der Nettofluoreszenz-Ratio aus, die weiterhin auf einem konstanten Niveau von 44 Einheiten persistierte. Dementsprechend waren weder die Qualität noch das Ausmaß des D600-induzierten Antagonismus durch eine Abhängigkeit von der Testsubstanz gekennzeichnet. Die Aufhebung der D600-vermittelten Inhibierung des spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Einstroms aus dem Medium wirkte sich in der terminalen Versuchsphase nicht wesentlich auf die Intensität der Fluoreszenz-Ratio aus, die sich mit einer langsamen Kinetik kontinuierlich dem ursprünglichen Basisniveau annäherte.

Die funktionelle Unversehrtheit der kultivierten B-Zellen wurde durch die Ansprechbarkeit der elektrisch aktiven Zellen gegenüber einem maximal depolarisierenden K^+ -Stimulus von 49,5 mM nachgewiesen. Dieser induzierte sowohl bei der Nettofluoreszenz als auch bei der Bruttofluoreszenz einen intensiven Anstieg der Fura-Ratio auf einen maximalen Wert (Minute 13). Die Aussetzen der experimentellen K^+ -Depolarisation erfolgte bei Minute 20 und äußerte sich - nach der Etablierung der charakteristischen Plateauphase (Minute 18) - durch die Reduktion der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf die ursprünglichen Basalwerte. Insgesamt resultierten sowohl auf der Ebene der Bruttofluoreszenz als auch auf der Ebene der Nettofluoreszenz vergleichbare $[Ca^{2+}]_i$ -Signalprofile.

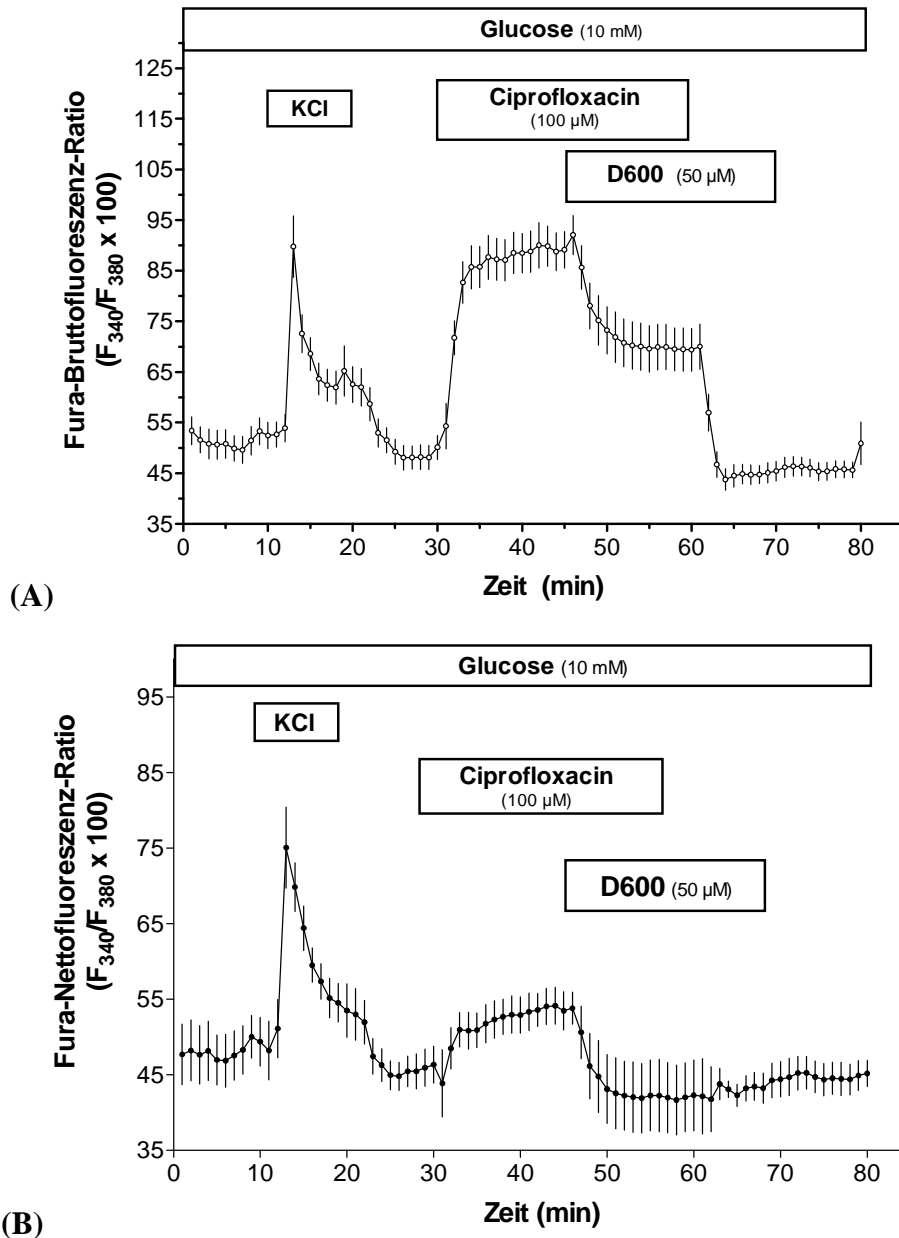


Abbildung 4.2.4.5 Effekt des Fluorchinolons Ciprofloxacin gegenüber der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus Die Reaktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während der Perifusion mit den angegebenen Testmedien in Präsenz von 10 mM Glucose wurde als Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Zeit charakterisiert. Die Resultate der unkorrigierten Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, sind in (A) dargestellt. Die in (B) abgebildete Registrierung repräsentiert die Fura-Nettofluoreszenz-Ratio, die durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von der Emission Fura-2-inkubierter B-Zellen berechnet wurde (s. Kap. 3.5.6). Die Exposition der auf Deckgläschen kultivierten und funktionell intakten B-Zellen mit dem Fluorchinolon erfolgte von Minute 30 bis Minute 60. Um die Abhängigkeit des Mechanismus von einem exogenen Ca^{2+} -Influx zu beurteilen, wurde das Medium ab Minute 45 zusätzlich mit D600 substituiert, einem Antagonisten des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals. Die Mittelwerte \pm SEM der Nettofluoreszenz-Ratio (B) wurden aus sieben Versuchszyklen berechnet, in denen insgesamt 32 Fura-2-inkubierte bzw. schein-inkubierte B-Zellen perfundiert wurden. Die Bruttofluoreszenz-Ratio \pm SEM (A) repräsentiert die Resultate von drei Einzelexperimenten, in denen 27 B-Zellen mit den dargestellten Testmedien perfundiert wurden..

Hinsichtlich der Glucose-Sensitivität der kultivierten B-Zellen verursachte ein moderater Glucose-Stimulus von 10 mM eine gering bis mäßig ausgeprägte Aktivierung des Energie-Metabolismus. Dieser Effekt trat bei den durch direkte Injektion der Collagenase in den *Ductus choledochus* isolierten B-Zellen durch ein geringfügig fluktuierendes Basisniveau in Erscheinung. Die während der Glucose-initiierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und des D600-vermittelten Antagonismus registrierten Intensitäten der Bruttofluoreszenz-Ratio und der korrespondierenden Nettofluoreszenz-Ratio sind durch vergleichbare Kinetiken und Signalprofile gekennzeichnet.

Wurde keine Nettofluoreszenz-Ratio gebildet, offenbarte sich die Interferenz zwischen den Fluoreszenzemissionen des Fluorchinolons und des Indikators Fura-2 durch eine zusätzliche Erhöhung der Fura-Fluoreszenz-Ratio um 20 Einheiten (s. Abb. 4.2.4.5 (A)). Diese Komponente zeigte sich gegenüber der Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 resistent, konnte jedoch durch das angewandte Korrekturverfahren vollständig aufgehoben werden. Demgegenüber wurden weder die Qualität noch die Quantität der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stimulierenden und durch D600 inhibierbaren Wirkung der Testsubstanz durch die Bildung der Nettofluoreszenz-Ratio modifiziert. Lediglich der D600-vermittelte Antagonismus des Fluorchinolon-Effektes wies nach der Berechnung der korrigierten Nettowerte höhere \pm SEM-Werte auf.

4.2.5 Modifizierende Wirkung congenerer N1-Fluorphenyl-Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration endokriner B-Zellen der NMRI-Albinomaus

Im Rahmen dieser Experimente wurde die Reaktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen während der Exposition mit vier congeneren Fluorchinolon-Derivaten explizit untersucht und als Fura-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert. Weder das p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1 noch die o-fluorphenylierten Fluorchinolone C2 und C4 sind - mit Ausnahme des veterinärmedizinisch eingesetzten Fluorchinolons Sarafloxacin (C3) - bisher in die therapeutischen Regime eingeführt worden. Im Hinblick auf die geringe Varianz der strukturellen und stereochemischen Eigenschaften wurden diese Substanzen als „Modell-Fluorchinolone“ in die Untersuchungen einbezogen, um aussagefähige Korrelationen zwischen der biologischen Aktivität und spezifischen Struktur-Komponenten identifizieren zu können.

4.2.5.1 Dimethyliertes *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C1

Das *p*-fluorphenylierte Fluorchinolon C1 induzierte von Minute 30 bis Minute 60 in der Präsenz einer Glucose-Konzentration von 10 mM eine eindeutig registrierbare Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (s. Abb. 4.2.5.1 (B)). Der maximale mit 100 μM der Testsubstanz erzielbare Effekt manifestierte sich nach einer Perifusion von acht Minuten. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernde Potenz der Substanz verursachte jedoch einen mäßig ausgeprägten Effekt, dessen Ausmaß lediglich einem Drittel des K^+ -evozierten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals (Minute 10 bis Minute 20) entsprach. Nach einer Latenz von drei Minute setzte der Effekt mit einer schnellen Kinetik ein und erhöhte die Ratio auf ein konstantes Niveau von 55 Einheiten, das während der gesamten Expositionsphase aufrechterhalten wurde.

Um die Beteiligung exogener Ca^{2+} -Ionen an dem Wirkungsmechanismus pharmakologisch zu analysieren, wurde das Krebs-Ringer-Medium ab Minute 45 mit D600, einem selektiven Inhibitor des spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanals, substituiert. Dessen hemmende Wirkung manifestierte sich nach einer Latenz von zwei Minuten als vollständige Suppression der Fluorchinolon-induzierten Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio auf das prästimulatorische Basisniveau. Ferner wurde das fluktuierende Kurvenprofil aufgehoben und auf den Bereich der basalen Verhältnisse egalisiert. Die Beendigung der Fluorchinolon-Perifusion (Minute 60) korrelierte mit einem erneut einsetzenden geringgradigen Anstieg der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio, der sich ungeachtet des D600-vermittelten Antagonismus kontinuierlich bis Minute 70 fortsetzte. Die in dem Diagramm (B) dargestellten Werte der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio verdeutlichen die mit diesen Prozess einhergehende Verminderung der inhibitorischen Potenz des Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten: ausgehend von Minute 60 durchlief das Kurvenprofil einen kontinuierlicher Anstieg auf einen Bereich von 50 Ratio-Einheiten. Diese oberhalb der ursprünglichen Basalwerte lokalisierte Ratio verringerte sich nach Beendigung der D600-Exposition und näherte sich in der terminalen Auswaschphase (Minute 70 bis Minute 80), in der die B-Zellen ausschließlich mit dem Krebs-Ringer-Basismedium perfundiert wurden, dem prästimulatorischen Bereich.

Die Induktion der primär kultivierten B-Zellen mit einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration von 49,5 mM (Minute 10 bis Minute 20) evozierte eine überschießende Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf einen maximalen Wert (80 Ratio-Einheiten). Dieser Effekt manifestierte sich bereits nach einer zweiminütigen Exposition der B-Zellen, wobei dessen Ausmaß mit einer ebenso prompten Kinetik verringert wurde, um bei Minute 16 das charakteristische plateauförmige Kurvenprofil zu durchlaufen.

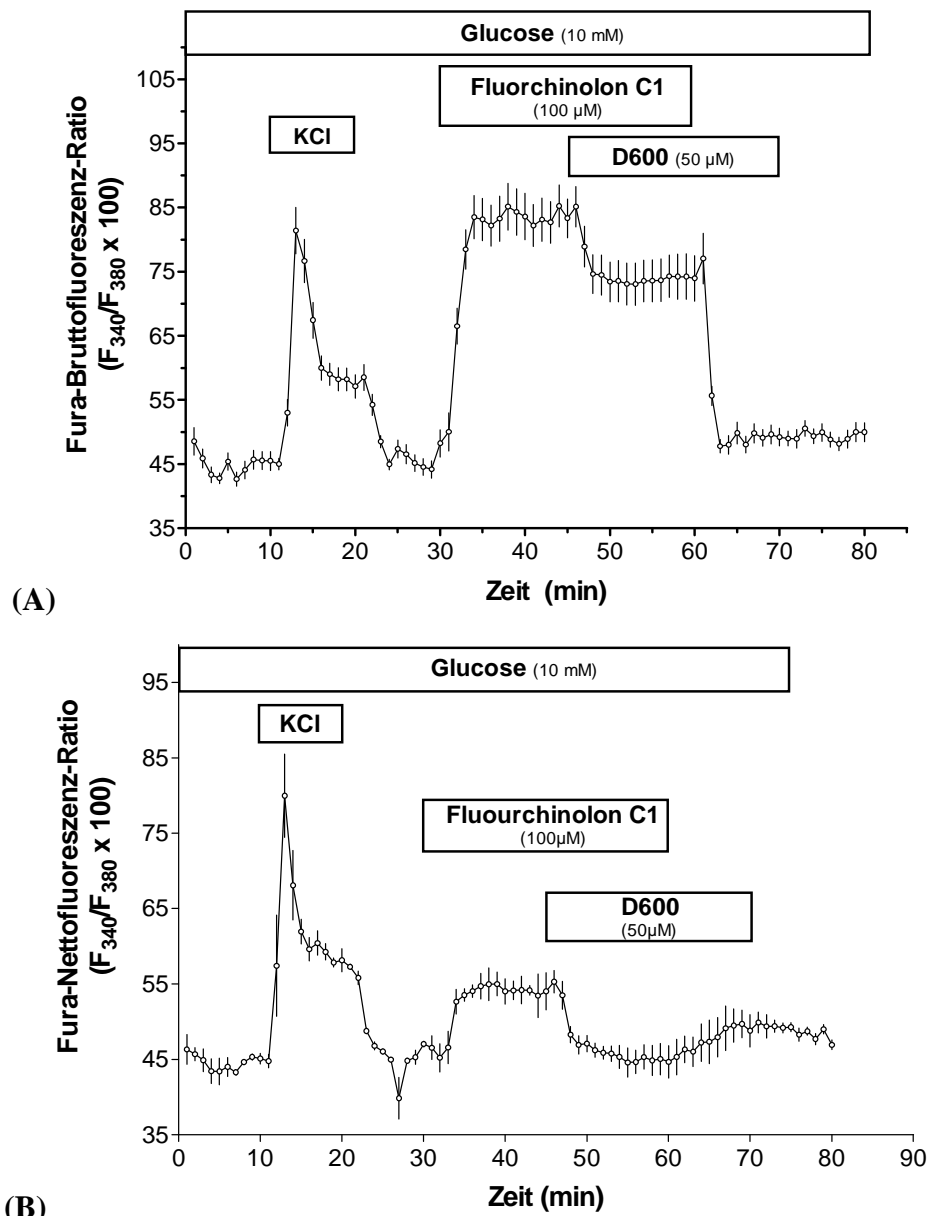


Abbildung 4.2.5.1 Ca^{2+} -stimulatorische Wirkung des *p*-Fluorphenyl-Fluorochinolons C1 gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus Die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen in dem Zytoplasma primär kultivierter B-Zellen des Pankreas wurde als unkorrigierte Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio (A) bzw. korrigierte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (B) in Abhängigkeit von der Zeit charakterisiert. Die Berechnung der Nettofluoreszenz-Ratio beruhte auf der Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von der Emission Fura-2-inkubierter B-Zellen (siehe Kap.3.5.6). Die funktionelle Integrität der B-Zellen wurde durch die charakteristische Ansprechbarkeit gegenüber einem exogenen K^+ -Stimulus (49,5 mM) belegt. Die Exposition mit dem Fluorochinolon C1 erfolgte von Minute 30 und wurde ab Minute 45 in Gegenwart des Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 bis Minute 60 fortgesetzt. Dieser befand sich für weitere zehn Minuten in dem Krebs-Ringer-Basismedium. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der Metabolismus der B-Zellen mit einem Glucose-Stimulus von 10 mM moderat aktiviert. Die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 29 Fura-2-inkubierten bzw. schein-inkubierten B-Zellen wurden in fünf Versuchszyklen (B) registriert. Die Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio \pm SEM (A) basiert auf den Ergebnissen von drei Einzelmessungen, in denen insgesamt 23 Fura-2-inkubierte B-Zellen perfundiert wurden.

Der Vergleich zwischen der berechneten Nettofluoreszenz und der korrespondierenden Bruttofluoreszenz dokumentiert gleichartige Muster der K^+ -induzierten Depolarisation, für die eine deutlich ausgeprägte Plateauphase kennzeichnend war. Das Aussetzen des experimentellen Stimulus (Minute 20) äußerte sich auf der Ebene der Bruttofluoreszenz-Ratio durch die Wiederherstellung der prästimulatorischen Verhältnisse, während die Nettofluoreszenz-Ratio unterhalb des Basalniveaus reduziert wurde. Der transiente Charakter dieses Effekts zeigte sich in der nächsten Minute durch die Egalisierung der Ratio auf die ursprünglichen Basalwerte (s. *Abb. 4.2.5.1 (B)*).

In Relation zu den B-Zellen, die nach dem konventionellen Collagenase-Digestions-Verfahren aus dem exokrinen Pankreas isoliert wurden, war das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau der mit 10 mM Glucose stimulierten B-Zellen durch Fluktuationen um einen Mittelwert von 45 Ratio-Einheiten gekennzeichnet. Diese traten insbesondere zu Beginn der Perfusion sowohl bei den Nettowerten als auch den Bruttowerten der Fura-Fluoreszenz-Ratio mit vergleichbaren Kinetiken in Erscheinung.

Sofern die Fura-Fluoreszenz-Ratio nicht von der endogenen Fluoreszenz der Testsubstanz dissoziiert wurde, verursachte das p-fluorphenylierte Fluorchinolon C1 eine erhebliche Steigerung der Fluoreszenz-Ratio um weitere 22 Einheiten (s. *Abb. 4.2.5.1 (A)*). Diese Komponente war durch eine D600-Resistenz charakterisiert und wurde unmittelbar nach der Beendigung der Fluorchinolon-Exposition (Minute 60) innerhalb von zwei Minuten vollständig aufgehoben. Das Ausmaß der D600-sensiblen Komponente des Fluorchinolon-Effektes wurde demgegenüber nicht durch das Korrekturverfahren beeinflusst. Die relative Standardabweichung \pm SEM der registrierten Fluoreszenz-Ratio umfasst bei den Bruttowerten sowie den Nettowerten eine vergleichbare Größenordnung.

4.2.5.2 Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2

Die Präsenz des o-fluorphenylierten Fluorchinolons C2 in dem Krebs-Ringer-Basismedium induzierte ausgehend von Minute 30 eine deutliche Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (s. *Abb. 4.2.5.2 (B)*). Charakterisiert als Fura-Fluoreszenz-Ratio entsprach das maximale Ausmaß des Effektes, welches mit einer Konzentration von 100 μ M der Testsubstanz erzielt werden konnte, einem Wert von 57 Einheiten. In Relation zu dem internen Standard bewirkte die $[Ca^{2+}]_i$ -steigernde Potenz des Fluorchinolons innerhalb von fünf Minuten einen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio oberhalb der Plateauphase der experimentellen K^+ -Depolarisation. Während der nachfolgenden Exposition wurde der initiale Anstieg der Fluoreszenz-Ratio einer kontinuierlichen Reduktion unterzogen, die bei Minute

45 ein Niveau von 54 Einheiten erreichte. In diesem Zusammenhang war das mit einer gleichmäßigen Periodizität oszillierende Kurvenprofil (s. Abb. 4.2.5.2 (B)) auffallend, das während der Fluorchinolon-Exposition registriert wurde.

Die Beteiligung eines über den spannungsabhängigen L-Typ- Ca^{2+} -Kanal vermittelten Influx exogener Ca^{2+} -Ionen wurde unter Verwendung des selektiven Antagonisten Methoxyverapamil (D600) analysiert. Die gleichzeitige Präsenz der Testsubstanz und des D600 (Minute 45) in dem Medium führte zu einer vollständigen Aufhebung des Fluorchinolon-induzierten Effektes. Die Reduktion der Nettofluoreszenz-Ratio unterhalb des prästimulatorischen Basisniveaus erfolgte mit einer langsamen Kinetik und wurde nach einer Exposition von neun Minuten auf einem *steady state* von 43 Einheiten nivelliert. Weder die Beendigung der Fluorchinolon-Perifusion (Minute 60) noch die fortgesetzte Exposition mit dem Inhibitor D600 verursachte eine Beeinträchtigung der Nettofluoreszenz-Ratio, die weiterhin auf dem konstanten Niveau sistierte. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass in Abwesenheit des Fluorchinolons C2 der D600-basierende Antagonismus weiterhin eine potente Suppression der ursprünglich oszillierenden Fura-Fluoreszenz-Ratio auf einem konstanten Niveau bewirkte.

Der weitere Verlauf der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio war in Abwesenheit jeglicher Testsubstanz (Minute 70 bis Minute 80) durch eine steigende Tendenz gekennzeichnet, die sich auf der Ebene der Nettofluoreszenz mit einer geringeren Intensität darstellte. Die Nivellierung der Fluoreszenz-Ratio auf die ursprünglichen Verhältnisse, die unter Basalbedingungen in dem System herrschten, dokumentiert die vollständigen Reversibilität der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stimulierenden Wirkung des o-fluorphenylierten Fluorchinolons C2 gegenüber den endokrinen B-Zellen.

Die funktionelle Integrität der kultivierten B-Zellen wurde durch die charakteristische Reaktion der Zellen gegenüber einem externen K^+ -Stimulus von 49,5 mM (Minute 10 bis Minute 20) nachgewiesen. Die experimentelle K^+ -Depolarisation führte mit einer prompten Kinetik zu einer effektiven Erhöhung der Fura-Fluoreszenz-Ratio, die einen maximalen Wert von 76 Einheiten (Nettofluoreszenz) bzw. 84 Einheiten (Bruttofluoreszenz) erreichte. Die weitere Entwicklung des Kurvenprofils war durch die charakteristische Plateauphase des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals gekennzeichnet, das bedingt durch die Beendigung der K^+ -Exposition innerhalb von drei Minuten auf das prästimulatorische Niveau reduziert wurde. Der Vergleich zwischen den Registrierungen der Nettofluoreszenz-Ratio und der Bruttofluoreszenz-Ratio dokumentiert gleichartige Muster und Kinetiken dieser K^+ -evozierten Depolarisation.

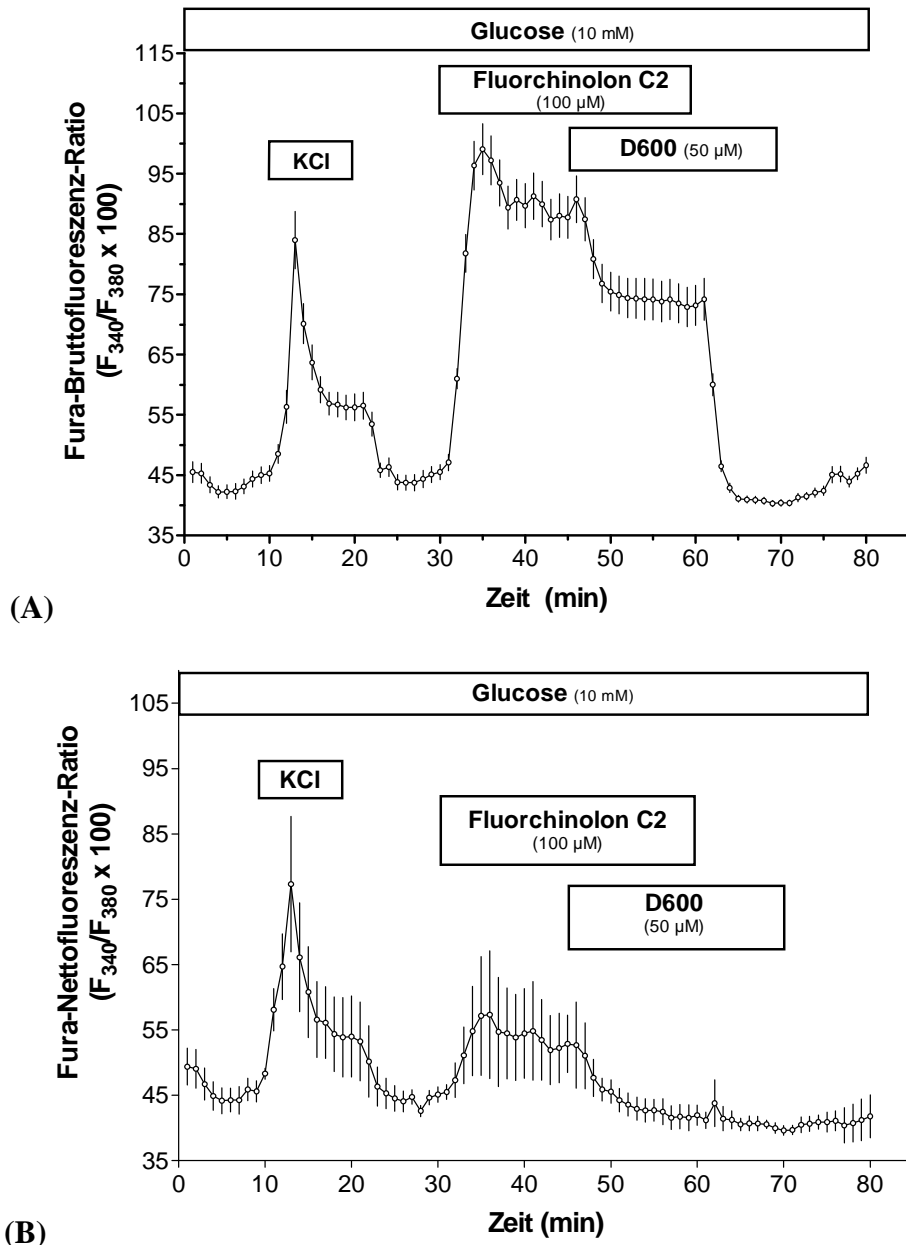


Abbildung 4.2.5.2 Reaktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen des Mauspankreas auf das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 Die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio - definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio - wird durch die Daten in (A) repräsentiert, während die von der Autofluoreszenz dissoziierte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio in (B) dargestellt ist. Diese wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von der Emission Fura-2-inkubierter B-Zellen berechnet (s. Kap. 3.5.6). Während der gesamten Versuchsphase befand sich eine mäßig stimulatorische Glucose-Konzentration von 10 mM in dem Medium. Die Beurteilung der funktionellen Integrität der kultivierten B-Zellen erfolgte von Minute 10 bis Minute 20 durch eine experimentell induzierte K^+ -Depolarisation. Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perfusion mit 100 μM der Testsubstanz C2 durchgeführt, wobei sich ab Minute 45 bis Minute 70 zusätzlich der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor D600 in dem Medium befand. Die Mittelwerte der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio \pm SEM (B) von insgesamt 27 Fura-2-inkubierten und 26 schein-inkubierten B-Zellen wurden in fünf Versuchszyklen registriert. Die in (A) dargestellten Mittelwerte der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio \pm SEM sind repräsentativ für 24 B-Zellen, die in drei Einzelexperimenten analysiert wurden.

Hinsichtlich der Glucose-Sensitivität und der basalen $[Ca^{2+}]_i$ -Verhältnisse der nach dem Collagenase-Injektions-Verfahren isolierten B-Zellen äußerte sich die moderate Stimulation des Energie-Metabolismus (10 mM Glucose) durch einen geringfügig fluktuierenden Kurvenverlauf. Die unregelmäßigen Oszillationen der Fluoreszenz-Ratio wurden ebenfalls während der Exposition mit der Testsubstanz C2 registriert und wurden durch die bereits charakterisierte Wirkung des Inhibitors D600 auf einen konstanten Wert suppremiert.

Sofern keine Nettofluoreszenz-Ratio gebildet wurde, äußerte sich die endogene Fluoreszenz des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 durch eine intensive Steigerung der Fluoreszenz-Ratio um weitere 20 Einheiten (s. Abb. 4.2.5.2 (A)). In Analogie zu dem Strukturisomer C1 zeigte die Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 keinen Einfluss auf diese Signalkomponente. Die Intensität des D600-vermittelten Antagonismus wurde durch die Dissoziation der endogenen Fluoreszenz von der Bruttofluoreszenz um ungefähr vier Einheiten reduziert. Dieser Prozess wirkte sich ebenfalls auf das Ausmaß des relativen Standardfehlers aus: die während der K^+ -induzierten Depolarisation und der Exposition mit dem Fluorchinolon registrierten \pm SEM-Werte der Nettofluoreszenz-Ratio weisen höhere Varianzen auf als die \pm SEM-Werte der korrespondierenden Bruttofluoreszenz-Ratio.

4.2.5.3 *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin)

Die in dem Diagramm (B) (s. Abb. 4.2.5.3) dargestellten Ergebnisse der Nettofluoreszenz-Ratio dokumentieren, dass die Perfusion der B-Zellen mit dem p-fluorphenylierten Fluorchinolon C3 (Sarafloxacin) eine nicht eindeutig zu beurteilende Wirkung hervorrief. Das maximale Ausmaß des mit einer Konzentration von 100 μ M der Testsubstanz erzielbaren Effektes entsprach einer Ratio von 47 Einheiten und differenzierte sich nicht wesentlich von dem prästimulatorischen Niveau (45 Einheiten). Der direkte Vergleich mit der experimentell induzierten K^+ -Depolarisation von Minute 10 bis Minute 20 verdeutlicht die marginale $[Ca^{2+}]_i$ -steigernde Potenz des Fluorchinolons Sarafloxacin. Die nach einer initialen Reduktion einsetzende Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio auf einem *steady state* von 47 Einheiten erforderte einen Zeitraum von sechs Minuten, wobei das Niveau weit unterhalb der Plateauphase der K^+ -evozierten Depolarisation lokalisiert war.

Die Abhängigkeit des Wirkungsmechanismus von dem Influx exogener Ca^{2+} -Ionen wurde durch die Substitution des Mediums mit dem selektiven L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor D600 analysiert. Dieser verursachte eine wahrnehmbare Reduktion der Fluoreszenz-Ratio um drei Einheiten unterhalb der prästimulatorischen Ratio.

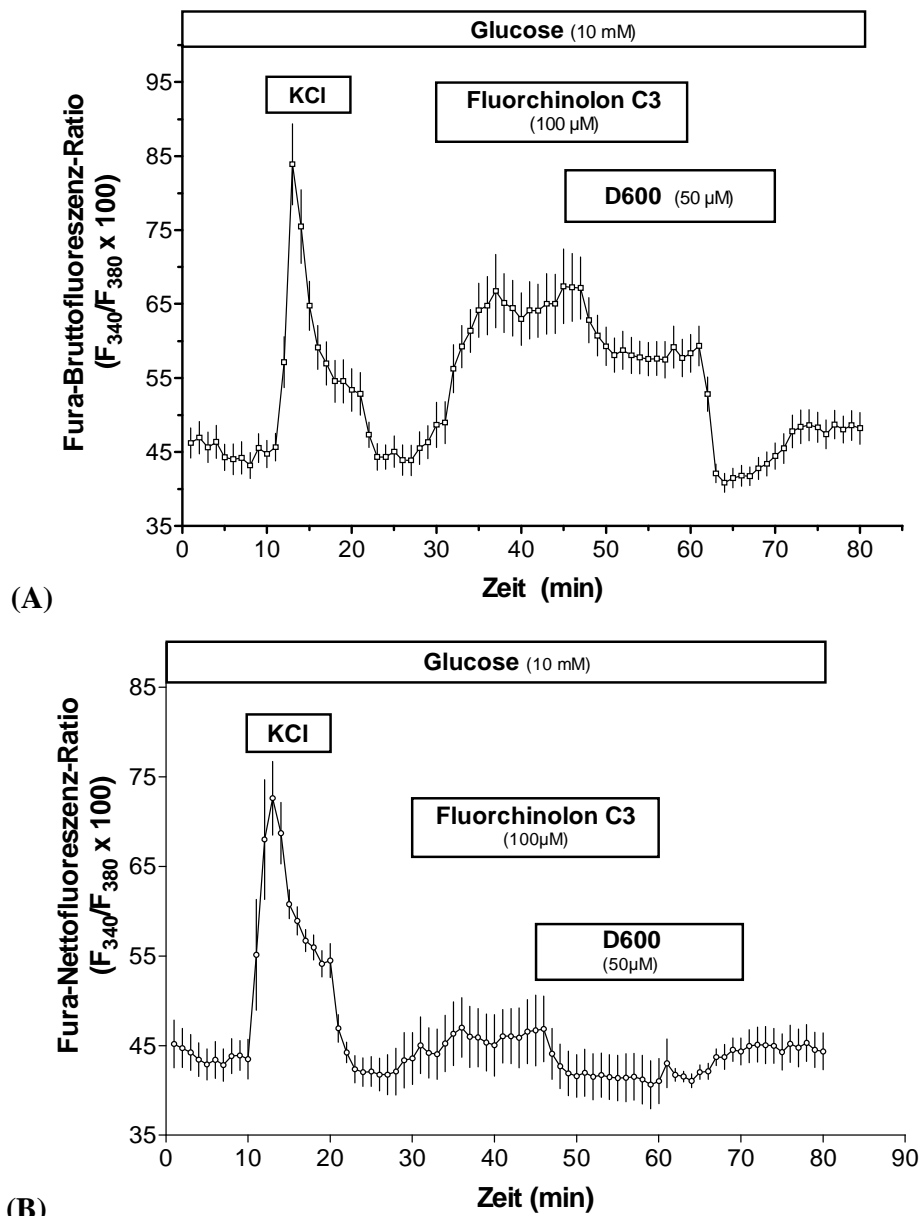


Abbildung 4.2.5.3 Wirkung des *p*-Fluorphenyl-Fluorchinolons C3 (Sarafloxacin) auf die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen des Mauspankreas
 Die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, wird durch die in (A) dargestellten Messwerte repräsentiert. Die Ergebnisse der korrigierten Fluoreszenz-Ratio, charakterisiert als Fura-Nettofluoreszenz-Ratio, sind in (B) abgebildet und wurden durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen Emission Fura-2-inkubierter B-Zellen errechnet (s. Kap. 3.5.6). Während der gesamten Versuchsphase wurde der Zell-Metabolismus mit einem moderaten Glucose-Stimulus (10 mM) aktiviert. Die Beurteilung der funktionellen Integrität der kultivierten B-Zellen beruhte auf der charakteristischen Ansprechbarkeit der Zellen auf eine maximal depolarisierende K^+ -Konzentration von 49,5 mM. Ab Minute 30 bis Minute 60 erfolgte die Exposition mit 100 μ M der Testsubstanz C2, die ab Minute 45 in Präsenz des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 fortgesetzt wurde. Dieser befand sich für weitere 10 Minuten in dem Medium. Die Mittelwerte der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio \pm SEM (A) repräsentieren die Resultate aus drei Perifusionen ($n = 28$). Die Fura-Nettofluoreszenz-Ratio \pm SEM (B) bezieht sich auf fünf Versuchszyklen, in denen insgesamt 28 Fura-2-inkubierte bzw. schein-inkubierte B-Zellen perfundiert wurden.

Kennzeichnend für den D600-induzierten Antagonismus war die schnelle Kinetik, die nach einer einminütigen Latenz innerhalb von drei Minuten eine vollständige Suppression des Fluorchinolon-Effektes bewirkte. Zudem wurde das fluktuierende Kurvenprofil in einen gleichförmigen Verlauf überführt.

Die Beendigung der 30 Minuten umfassenden Perifusionsphase mit der Testsubstanz C3 bei Minute 60 korrelierte mit einem erneuten Anstieg der Fluoreszenz-Ratio, der sich mit besonderer Intensität bei der unkorrigierten Bruttofluoreszenz-Ratio darstellte (s. *Abb. 4.2.5.3 (A)*). Als Konsequenz der verminderten inhibitorischen Potenz des Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten war der weitere Verlauf des Kurvenprofils durch einen progredienten Anstieg der Fura-Ratio gekennzeichnet. Dementsprechend herrschten bereits unmittelbar vor der Beendigung der D600-Exposition die ursprünglichen Verhältnisse, die unter Basalbedingungen registriert wurden. Während der terminalen Perifusion (Minute 60 bis Minute 70) mit dem Krebs-Ringer-Medium nivellierte sich die Fluoreszenz-Ratio auf dieses konstante Niveau. Demzufolge war der Fluorchinolon-induzierte Effekt durch einen reversiblen Charakter gekennzeichnet.

Die Präsenz einer maximal depolarisierenden K^{+} -Konzentration von 49,5 mM in dem Basismedium (Minute 10 bis Minute 20) initiierte eine intensive Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio, die innerhalb von einer Minute das absolute Maximum der Messung erreichte. Dieses für funktionell intakte B-Zellen des Pankreas kennzeichnende Signalmuster, das sich aus einem initialen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und einer nachfolgenden Reduktion der Signalintensität auf ein plateauförmiges Niveau zusammensetzt, wurde mit vergleichbarer Kinetik sowohl bei der Bruttofluoreszenz-Ratio als auch bei der korrespondierenden Nettofluoreszenz-Ratio registriert.

Die Induktion des Zell-Metabolismus durch einen moderaten Glucose-Stimulus von 10 mM führte zu Fluktuationen des basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Niveaus, die mit adäquater Amplitude und Frequenz bei den Nettowerten und den Bruttowerten der Fluoreszenz-Ratio in Erscheinung traten. Diese Beobachtung deutet auf die erhöhte Glucose-Sensibilität der B-Zellen hin, die durch direkte Injektion der Collagenase aus dem exokrinen Pankreas isoliert wurden.

Die endogene Fluoreszenz der Testsubstanz verursachte, sofern auf die Bildung der Nettofluoreszenz-Ratio verzichtet wurde, eine moderate Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio um weitere 10 Einheiten (s. *Abb. 4.2.5.3 (A)*). Dieser Effekt wurde durch die Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 weder in der Intensität noch in der Qualität beeinflusst, jedoch durch die Berechnung der Nettofluoreszenz-Ratio vollständig aufgehoben.

Das Ausmaß des D600-vermittelten Antagonismus der Fluorchinolon-induzierten Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio wurde durch das Korrekturverfahren nicht wesentlich beeinträchtigt. Hinsichtlich des relativen Standardfehlers der registrierten Netto- und Bruttowerte wurden vergleichbare \pm SEM-Beträge ermittelt.

4.2.5.4 *o*-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4

In Relation zu dem Strukturisomer C3 führte die Exposition mit dem Fluorchinolon C4 von Minute 30 bis Minute 60 zu ausgeprägten Fluktuationen des basalen $[Ca^{2+}]_i$ -Niveaus, die nicht eindeutig auf einen Anstieg der zytosolische Konzentration schließen ließen (s. Abb. 4.2.5.4 (B)). Erschwert wurde die sichere Beurteilung der $[Ca^{2+}]_i$ -modulierenden Eigenschaften der Testsubstanz C4 sowohl durch die hohe Amplitude der fluktuierenden Fluoreszenz-Ratio sowie das hohe Ausmaß des relativen Standardfehlers der berechneten Nettowerte. Diese Problematik äußerte sich bei den registrierten Bruttowerten der Fura-Fluoreszenz-Ratio mit einer weitaus geringeren Intensität, so dass diese unkorrigierten Daten bei der Beurteilung des Effektes gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration berücksichtigt wurden.

Der mit 100 μ M des *o*-Fluorphenyl-Fluorchinolons C4 erzielbare Effekt verursachte initial eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz-Ratio, die nach einer Exposition von fünf Minuten - ausgehend von einem basalen Niveau von 50 Einheiten - einen geringen Anstieg erkennen ließ. Dieser erreichte innerhalb von fünf Minuten mit einer langsamen Kinetik das maximale Ausmaß des Effektes, entsprechend einer Ratio von 56 Einheiten. In Relation zu dem internen Standard verdeutlicht sich das geringe Ausmaß der induzierten Steigerung: die Intensität der Nettofluoreszenz-Ratio erreichte lediglich einen Bereich, der unterhalb des Plateaus der K^+ -Depolarisation lokalisiert war. In der Gesamtheit erforderte die ineffiziente Wirkung der Testsubstanz C4 eine zehnminütige Exposition, um einen wahrnehmbaren Anstieg der Fura-Ratio hervorzurufen. Als weitere Konsequenz der geringen $[Ca^{2+}]_i$ -steigernde Potenz ist der instabile Charakter der Ratio-Erhöhung anzusehen, die bereits in der nächsten Minute kontinuierlich auf den initialen Ausgangswert von 50 Einheiten reduziert wurde.

Die Abhängigkeit der Fluorchinolon-induzierten Wirkung von einem Influx exogener Ca^{2+} -Ionen wurde durch die Perifusion der isolierten B-Zellen mit dem selektiven Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 über einen Zeitraum von 25 Minuten analysiert. Dessen inaktivierende Wirkung gegenüber dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal verursachte sowohl auf der Ebene der Bruttofluoreszenz als auch der Nettofluoreszenz nach einer zweiminütigen Retention eine marginale Verringerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio.

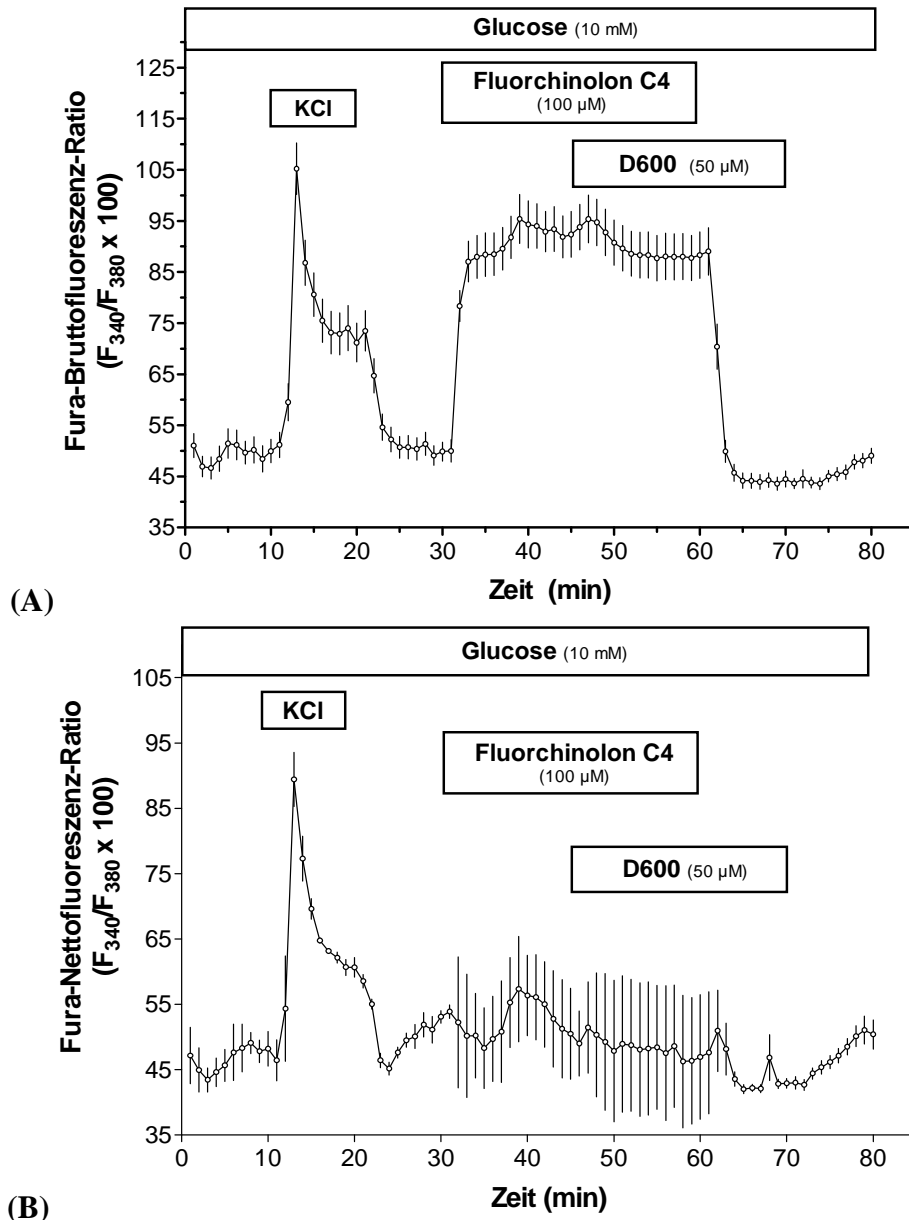


Abbildung 4.2.5.4 Wirkung des o-Fluorphenyl-Fluorochinolons C4 gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der Maus Die Ca^{2+} -steigernde Potenz des Fluorochinolons C4 wurde als Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Zeit charakterisiert. Die unkorrigierte Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, wird durch die Registrierung in (A) repräsentiert. Die durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen Fura-2-inkubierter B-Zellen errechnete Fura-Nettofluoreszenz-Ratio wird durch die in (B) dargestellte Registrierung dokumentiert. Die funktionelle Integrität und elektrische Aktivität der kultivierten B-Zellen wurde durch eine experimentell induzierte K^+ -Depolarisation (49,5 mM) geprüft. Die eigentliche Perfusion mit der Testsubstanz in einer Konzentration von 100 μM wurde von Minute 30 bis Minute 60 durchgeführt. Die Abhängigkeit des Effektes von einem exogenen Ca^{2+} -Influx wurde durch die Exposition der B-Zellen mit dem L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor D600 von Minute 45 bis Minute 70 analysiert. Die Mittelwerte der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio \pm SEM (B) beziehen sich auf fünf Versuchszyklen, in denen insgesamt 24 Fura-2-inkubierte bzw. unbeladene B-Zellen perfundiert wurden. Die Mittelwerte der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio \pm SEM (A) von 19 B-Zellen wurden aus den Resultaten dreier Einzelerperimente berechnet.

Die Beendigung der Fluorchinolon-Perifusion (Minute 60) korrelierte mit einer prompten Verringerung der Nettofluoreszenz-Ratio auf das fluktuierende Basisniveau - entsprechend einer Ratio von 44 Einheiten. Die in dem Diagramm (B) dargestellten Nettowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio verdeutlichen die mit dem Auswaschen des Fluorchinolons C4 einhergehende Intensivierung des D600-vermittelten Antagonismus.

Die Abwesenheit der Testsubstanz sowie des Inhibitors D600 während der terminalen Versuchshase (Minute 70 bis Minute 80), in der die B-Zellen ausschließlich mit dem Glucose-substituierten Krebs-Ringer-Basismedium perfundiert wurden, äußerte sich nach einer Latenzphase von zwei Minuten durch einen erneuten Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio, der mit besonderer Intensität bei der Nettofluoreszenz-Ratio einsetzte. Dieses Phänomen ist als Indiz für die Reversibilität der nur unsicher zu beurteilenden Wirkung des Fluorchinolons auf die endokrinen B-Zellen aufzufassen.

Die Präsenz einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration (49,5 mM) in dem Basismedium von Minute 10 bis Minute 20 induzierte eine effektive Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf ein Maximum von 90 Einheiten (s. Abb. 4.2.5.4 (B)). Dieses Signal manifestierte sich sowohl bei der Nettofluoreszenz als auch bei der Bruttofluoreszenz mit einer schnellen Kinetik innerhalb von zwei Minuten und wies bereits in der nächsten Minute eine absteigende Tendenz auf, die sich bei Minute 16 einem *steady state* annäherte. Die intensive Ansprechbarkeit der endokrinen B-Zellen gegenüber dem exogenen K^+ -Stimulus zeigte sich bei der Bruttofluoreszenz-Ratio und der korrespondierenden Nettofluoreszenz-Ratio durch gleichartige Muster und Kinetiken der $[Ca^{2+}]_i$ -Signale. Die Verringerung der extensiven K^+ -Konzentration auf die prästimulatorischen Verhältnisse verursachte auf der Ebene der Bruttofluoreszenz eine Reduktion der Fluoreszenz-Ratio auf das basale Niveau, wohingegen bei der Nettofluoreszenz-Ratio erneut intensive Fluktuationen registriert werden konnten.

Im Vergleich zu den B-Zellen, die nach dem konventionellen Collagenase-Digestions-Verfahren aus dem exokrinen Pankreas isoliert wurden, war das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau der nach dem modifizierten Verfahren isolierten und mit 10 mM Glucose stimulierten B-Zellen durch ausgeprägte Fluktuationen gekennzeichnet (s. Abb. 4.2.5.4 (B)). Diese hohe Glucose-Sensitivität und die damit einhergehende erhöhte elektrische Aktivität der primär kultivierten B-Zellen waren bei diesen Perifusionsmessungen besonders intensiv ausgeprägt. Belegt wird dieser Sachverhalt durch die erhöhte Rauschintensität, die sich bei der Bruttofluoreszenz-Ratio in einem wesentlich geringeren Ausmaß darstellte. Dementsprechend waren die Nettowerte als auch die Bruttowerte der Fura-Fluoreszenz-Ratio durch divergente Kinetiken

der Glucose-initiierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie des D600-induzierten Effektes gekennzeichnet.

Sofern die endogene Fluoreszenz des Fluorochinolons C4 nicht durch die Bildung der Nettofluoreszenz-Ratio dissoziiert wurde, bewirkte die Testsubstanz eine ausgeprägte Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio um weitere 25 Einheiten (s. Abb. 4.2.5.4 (A)). Diese auffällig rechteckförmige Signalkomponente der Fura-Ratio wurde durch die Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 nicht antagonisiert, konnte jedoch durch die Anwendung des Korrekturverfahrens vollständig aufgehoben werden. Das geringe bzw. nicht eindeutig zu beurteilende Ausmaß des D600-vermittelten Effektes wurde durch das Korrekturverfahren nicht wesentlich verändert. Demgegenüber wurde durch die Berechnung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio die bereits erwähnte Erhöhung der \pm SEM-Werte hervorgerufen, wobei sich dieser Effekt weitgehend auf diejenigen Versuchsdaten auswirkte, die während der Exposition der B-Zellen mit den Testsubstanzen registriert wurden.

4.3 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wirkung ausgewählter Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter B-Zellen der SUR1-*knock out*-Maus

Die Entkopplung des K_{ATP} -Kanal-abhängigen „*triggering pathway*“ von dem als „*amplifying pathway*“ definierten Regulationsmechanismus, der sich auf distaler Ebene der Energie-Metabolismus manifestiert, ist pharmakologisch oder genetisch durch die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals realisierbar. In der Vergangenheit wurden unabhängig voneinander zwei transgene Mausmodelle entwickelt, deren endokrine B-Zellen bedingt durch Mutationen in der porenbildenden $\text{K}_{\text{ir}}6.2$ -Untereinheit (Miki et al., 1998) oder in der regulatorischen SUR1-Untereinheiten (Seghers et al., 2000) nicht in der Lage sind, funktionelle K_{ATP} -Kanäle zu exprimieren.

Das SUR1-*k.o.*-Mausmodell weist phänotypisch weder Störungen der Glucose-Homöostase noch auffällige Symptome auf, die auf eine Beeinträchtigung der Vermehrungs- und Entwicklungsfähigkeit schließen ließen. Auf der Ebene der Langerhans-Inseln korreliert die Abwesenheit des K_{ATP} -Kanals jedoch mit einer verminderten Glucose-Sensitivität (Seghers et al., 2000) sowie einer unter substimulatorischen Bedingungen bereits dauerhaft erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder intensiven Ca^{2+} -Oszillationen (Miki et al., 1998). In einigen Studien wurde gezeigt, dass die basale Insulinsekretions-Rate den Normwerten entspricht und Glucose - obgleich mit einer wesentlich geringeren Effizienz - weiterhin als Stimulus der Insulinsekretion wirksam ist (Nenquin et al., 2004). Die aus SUR1-*knock out*-Mäusen isolierten B-Zellen repräsentieren demgemäß ein geeignetes Modell, um

K_{ATP}-Kanal-unabhängige Effekte der Fluorchinolone gegenüber der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration zu analysieren.

Zu bemerken ist an dieser Stelle, dass die isolierten B-Zellen der SUR1-*knock out*-Maus - im Folgenden als SUR1-*k.o.*-B-Zellen bezeichnet - im Vergleich zu den endokrinen B-Zellen der NMRI-Albinomaus durch eine verringerte basale Ratio und eine sehr variable elektrische Aktivität bzw. Reaktivität gegenüber den Testsubstanzen gekennzeichnet waren. In der Konsequenz weisen die ermittelten Befunde bei einigen Messungen eine höhere Varianz und dementsprechend höhere \pm SEM-Werte auf. Aufgrund der in *patch clamp*-Versuchen und in der Prüfphase von Minute 10 bis Minute 20 der Umströmungen nachgewiesenen funktionellen Integrität der Zellen, sind von validen Messdaten auszugehen. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der explizit für jedes der drei analysierten Fluorchinolone durchgeführten einfaktoriellen Varianzanalyse (Anova) bestätigt, die für jede Testsubstanz signifikante biologische Effekte indiziert.

Die mikrofluorimetrischen Perfusionen der K_{ATP}-Kanal-defizienten SUR1-*k.o.*-B-Zellen wurden nach dem gleichen experimentellen Protokoll durchgeführt, das bei den Analysen der pankreatischen B-Zellen weiblicher NMRI-Albinomäuse zu Grunde lag. Die Dissoziation zwischen der ausschließlich Ca²⁺-regulierten Fura-Fluoreszenz-Ratio und der Autofluoreszenz der Fluorchinolone basierte ebenfalls auf der Berechnung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio nach dem in Kapitel 3.5.6 erläuterten Subtraktions-Prinzip.

4.3.1 Lomefloxacin

Die Exposition der SUR1-*k.o.*-B-Zellen mit 100 μ M des Fluorchinolons Lomefloxacin induzierte einen moderaten Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio um 55 Einheiten (s. Abb. 4.3.1 (B)). Die vollständige Ausprägung des Effektes erforderte eine Expositionsphase von 11 Minuten. Bezogen auf die Plateauphase der K⁺-evozierten Depolarisation (Minute 10 bis Minute 20) erreichte die mit einer geringen Dynamik einsetzende Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio ein um fünf Einheiten höheres Niveau.

Um die Abhängigkeit des K_{ATP}-Kanal-unabhängigen Mechanismus von dem Einstrom exogener Ca²⁺-Ionen zu beurteilen, wurde die Perfusion in Gegenwart des L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Antagonisten D600 (Minute 45) fortgesetzt. Die inhibitorische Wirkung verursachte eine kontinuierliche, jedoch mäßig ausgeprägte Verringerung der Fluoreszenz-Ratio, die bei Minute 52 in einem *steady state* mündete. Dieser befand sich in dem Bereich des prästimulatorischen Basisniveaus und wurde während der nachfolgenden D600-Exposition unverändert aufrechterhalten. Die Aufhebung des induzierten Effektes setzte

unmittelbar nach der Beendigung der Perifusion mit dem Fluorchinolon (Minute 60) ein. Die in dem Diagramm (B) dargestellte Fura-Nettofluoreszenz-Ratio dokumentiert diesen Prozess durch die Reduktion der Signalintensität auf den Bereich der prästimulatorischen Verhältnisse, die vor der K^+ -Depolarisation in dem Zytosol herrschten. Basierend auf dieser Beobachtung zeigte der Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor D600 in Abwesenheit des Fluorchinolons Lomefloxacin eine erhöhte antagonistische Potenz, die mit unverminderter Wirkstärke die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration auf einen geringen Wert suppressierte.

Nach Beendigung der Exposition mit dem Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 wies der Verlauf der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf der Ebene der Bruttowerte keine weiteren Veränderungen auf. Die korrespondierende Nettofluoreszenz-Ratio sistierte ebenfalls in dem Bereich der ursprünglichen $[Ca^{2+}]_i$ -Verhältnisse, die unter Basalbedingungen einem Mittelwert von 38 Ratio-Einheiten entsprachen. Demgemäß wurde auch in der terminalen Perifusionsphase in Abwesenheit jeglicher Testsubstanzen das Ausmaß der Fluoreszenz-Ratio auf das prästimulatorische Niveau determiniert. Die registrierten Daten belegen, dass der Fluorchinolon-induzierte K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wirkungsmechanismus - in Analogie zu den unter Verwendung pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus analysierten Effekten - durch einen reversiblen Charakter gekennzeichnet war.

Die Reaktivität der auf Deckgläschen kultivierten SUR1-*k.o.*-B-Zellen war durch eine geringe Ansprechbarkeit sowohl gegenüber einem moderaten Glucose-Stimulus (10 mM) als auch einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration charakterisiert. Diese Eigenschaft manifestierte sich in erster Linie durch die gering ausgeprägte basale Nettofluoreszenz-Ratio, die unter diesen Bedingungen einem Niveau von 38 Einheiten entsprach. Ferner induzierte die Exposition mit dem exogenen K^+ -Stimulus von Minute 10 bis Minute 20 lediglich eine mäßige Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio auf einen maximalen Wert von 64 Einheiten (s. Abb.4.3.1 (B)). Die in der Regel prompt einsetzende Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgte bei den K_{ATP} -Kanal-defizienten B-Zellen mit einer verzögerten Kinetik sowie einer geringen Effizienz, die sich durch die marginal ausgeprägte Plateauphase der K^+ -Depolarisation bemerkbar machte. Diese gering ausgeprägte Stimulierbarkeit der transgenen Zellen wird sowohl durch die Bruttofluoreszenz- als auch die Nettofluoreszenz-Ratio dokumentiert, die hinsichtlich der Dynamik und der Intensität der K^+ -Depolarisation ein vergleichbares Signalprofil gekennzeichnet sind.

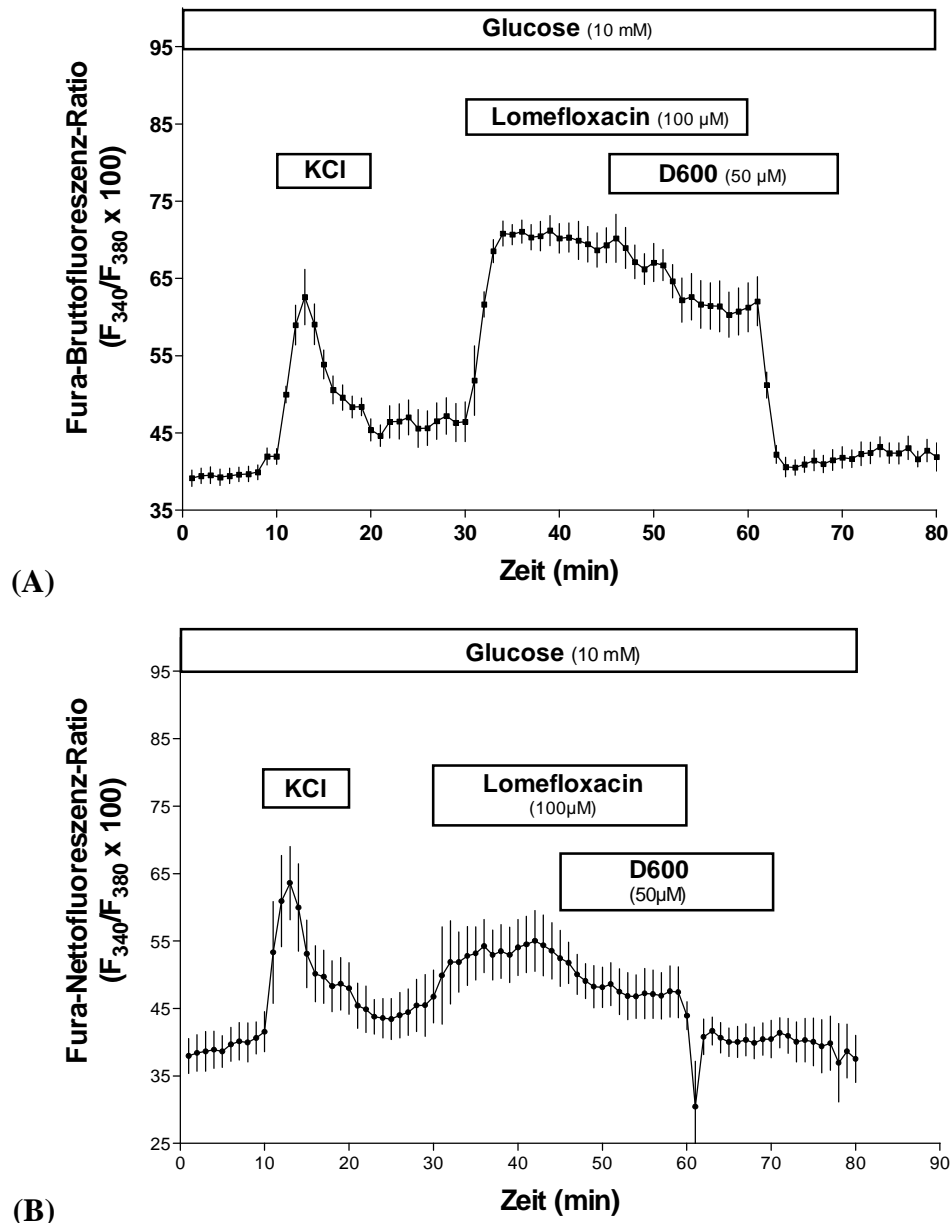


Abbildung 4.3.1 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wirkung des Fluorchinolons Lomefloxacin auf die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der SUR1-k.o.-Maus In dieser Versuchsreihe wurden endokrine B-Zellen der SUR1-k.o.-Maus verwendet, die keine funktionellen K_{ATP} -Kanäle exprimieren. Die in (A) dargestellten Messwerte repräsentieren die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio. Die in (B) präsentierten Werte stellen demgegenüber die korrigierte Nettofluoreszenz-Ratio dar. Diese wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter B-Zellen von derjenigen Fura-2-inkubierter B-Zellen errechnet (s. Kap. 3.5.6). Um die funktionelle Integrität der isolierten B-Zellen des Pankreas zu beurteilen, erfolgte von Minute 10 bis Minute 20 die Stimulation mit einer maximal depolarisierenden K^+ -Konzentration von 49,5 mM. Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perfusion mit 100 μ M Lomefloxacin durchgeführt und von Minute 45 bis Minute 70 in Anwesenheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 fortgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 19 Fura-2-inkubierten und 22 schein-inkubierten SUR1-k.o.-B-Zellen, die in drei (A) Einzelexperimenten bzw. vier (B) Versuchszyklen ermittelt wurden. Die Signifikanz der Versuchdaten wurde in einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Anova) mit $p < 0,0001$ belegt (Konfidenzintervall 95 %).

In Relation zu den B-Zellen der NMRI-Albinomaus, die ebenfalls durch direkte Injektion der Collagenase in den *Ductus choledochus* aus dem exokrinen Pankreas isoliert wurden, war das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau der mit 10 mM Glucose stimulierten B-Zellen gleichförmiger ausgeprägt. Fluktuationen der Fura-Fluoreszenz-Ratio konnten - ungeachtet der moderaten Aktivierung des Zell-Metabolismus mit 10 mM Glucose – bei den K_{ATP} -Kanal-defizienten B-Zellen nicht registriert werden.

Wurde keine Nettofluoreszenz-Ratio gebildet, so verursachte die intrinsische Fluoreszenzaktivität des Fluorchinolons Lomefloxacin auch bei diesem experimentellen Protokoll eine ausgeprägte Steigerung der Fluoreszenz-Ratio um weitere 17 Einheiten (s. Abb. 4.3.1 (A)). Diese Komponente zeigte sich gegenüber der antagonistischen Wirkung des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 resistent, konnte jedoch durch die Berechnung der Nettofluoreszenz-Ratio (s. Kap. 3.5.6) von der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 dissoziiert werden.

Das geringe Ausmaß des D600-vermittelten Antagonismus wurde durch die Korrektur der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio nicht beeinflusst, jedoch stellte sich dieser Effekt bei der korrespondierenden Nettofluoreszenz-Ratio mit höherer Deutlichkeit dar. Die relative Standardabweichung der Fura-Ratio wurde durch das Korrekturverfahren geringfügig erhöht.

4.3.2 Dimethyliertes o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2

In direktem Vergleich mit dem Fluorchinolon Lomefloxacin ist bei dem o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 eine Wirkung gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der K_{ATP} -Kanal-defizienten B-Zellen nicht eindeutig verifizierbar. Während der Perfusion der primär kultivierten SUR1-*k.o.*-B-Zellen mit der Testsubstanz von Minute 30 bis Minute 60 konnte keine sicher zu beurteilende Steigerung der Fluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.3.2 (B)) registriert werden. Zusätzlich erschwerte wurde die Analyse durch die kontinuierliche Verringerung der basalen Fluoreszenz-Ratio, die initial einem Wert von 50 Einheiten entsprach und in der terminalen Versuchsphase lediglich 38 Einheiten erreichte.

Der maximale Effekt, der mit einer Konzentration von 100 μ M der Testsubstanz C2 evoziert werden konnte, differenzierte sich nicht eindeutig von dem prästimulatorischen Niveau und war dem Ausmaß der experimentellen K^+ -Depolarisation deutlich unterlegen. Hinsichtlich der steigenden Tendenz des Kurvenprofils, das nach einem Zeitraum von zehn Minuten ein konstantes Niveau erreichte, ist von einer sehr geringen Erhöhung der Nettofluoreszenz-Ratio auszugehen.

Die Wirkung des selektiver L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 wurde von Minute 45 bis Minute 70 der Perifusion analysiert, dessen Präsenz eine moderate Reduktion der Fura-Fluoreszenz-Ratio induzierte. Das maximale Ausmaß des Antagonismus manifestierte sich nach einer Exposition von acht Minuten und äußerte sich durch eine marginale Verringerung der Fluoreszenz-Ratio (acht Einheiten) auf einem *steady state* von 45 Einheiten. Dieser befand sich um fünf Ratio-Einheiten unterhalb des prästimulatorischen Bereiches.

Die Beendigung der Fluorchinolone-Perifusion korrelierte mit einer weiteren Reduktion der Nettofluoreszenz-Ratio auf ein minimales Niveau, das deutlich unterhalb der basalen Verhältnisse lokalisiert war und während der nachfolgenden Perifusion unverändert aufrechterhalten wurde. Demzufolge induzierte der Antagonist D600 auch in Abwesenheit des Fluorchinolons eine effiziente Suppression der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unterhalb der prästimulatorischen Bereichs.

Die Abwesenheit sowohl des Fluorchinolons als auch des Ca^{2+} -Kanal-Inhibitors D600 (Minute 70) verursachte in der terminalen Perifusionsphase einen geringgradigen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio, der ab Minute 76 eine sicher wahrnehmbare Intensität erreichte. Diese Beobachtung lässt nicht eindeutig auf die Reversibilität der in Anwesenheit der Testsubstanzen hervorgerufenen Effekte schließen, da sich die Nettofluoreszenz-Ratio mit einer verzögerten Dynamik dem ursprünglichen Niveau annäherte. In Relation zu den korrespondierenden Werten der Bruttofluoreszenz-Ratio ist jedoch von einer Wiederherstellung der ursprünglichen Verhältnisse bei fortgesetzter Perifusion auszugehen.

Die Stimulation der K_{ATP} -Kanal-defizienten SUR1-*k.o.*-B-Zellen mit einer maximal depolarisierenden K^{+} -Konzentration (49,5 mM) induzierte mit einer prompten Kinetik einen moderaten Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio, dessen maximales Ausmaß sowohl bei den Nettowerten als auch bei den Bruttowerten 74 Einheiten (Minute 13) erreichte. Ungeachtet des variierenden Basalniveaus, das unter prästimulatorischen Bedingungen einer Bruttofluoreszenz-Ratio von 35 Einheiten bzw. einer Nettofluoreszenz-Ratio von 53 Einheiten entsprach, wurde ein gleichartiges $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -Muster während der K^{+} -evozierten Depolarisation registriert. Nach der Etablierung des Maximums bei Minute 13 erfolgte eine progrediente Reduktion der Fura-Ratio, die sich bei Minute 15 einem *steady state* annäherte. Die Beendigung der K^{+} -Exposition (Minute 20) führte sowohl bei der Brutto- als auch bei der Nettofluoreszenz-Ratio mit einer Latenz von zwei Minuten zu der Wiederherstellung der basalen Verhältnisse.

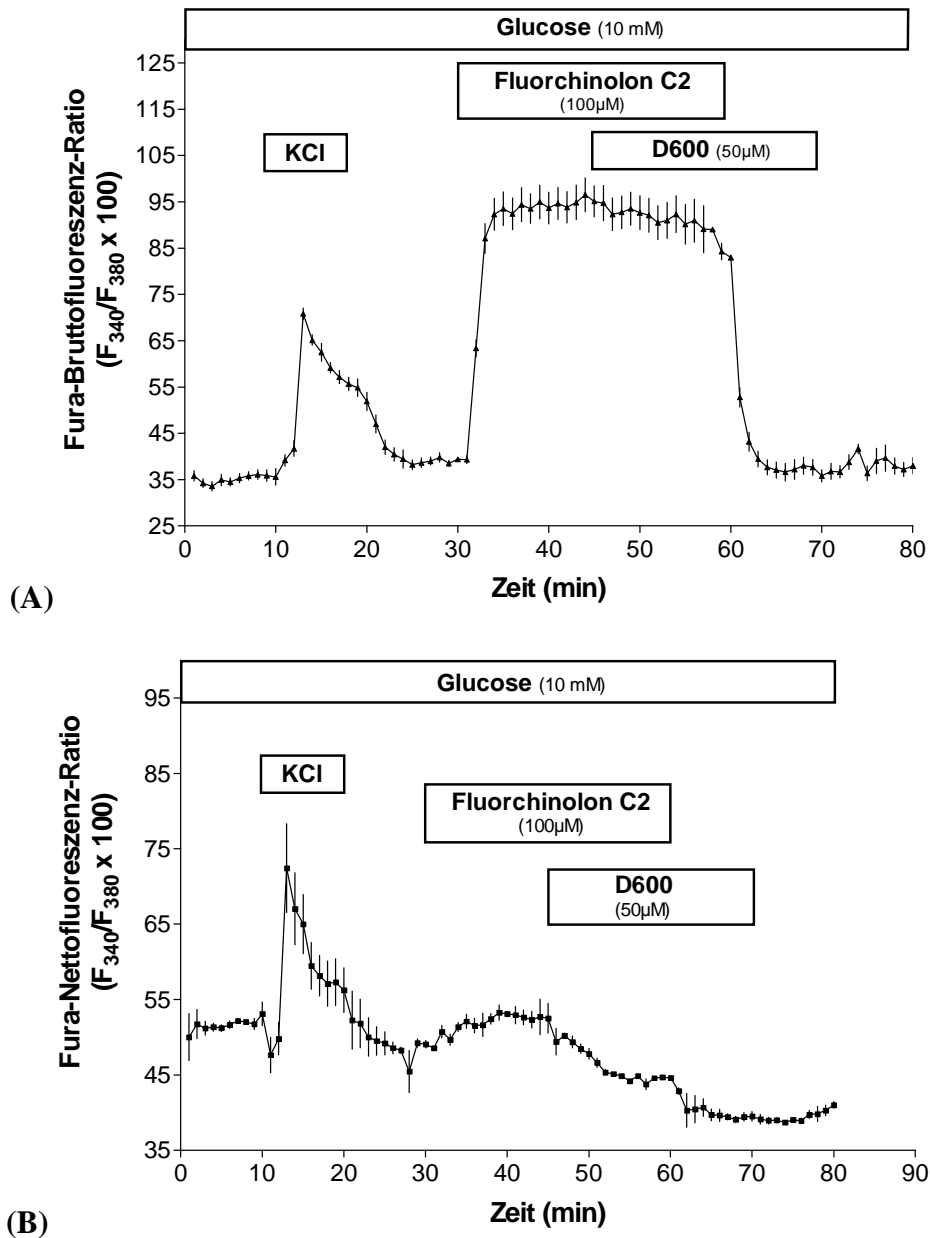


Abbildung 4.3.2 K_{ATP} -Kanal-unabhängiger Effekt des *o*-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration isolierter SUR1-k.o.-B-Zellen Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration wurde in Abhängigkeit von der Zeit registriert und als Fura-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert. In (A) sind die Resultate der unkorrigierten Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, dargestellt. Die in (B) dokumentierten Ergebnisse repräsentieren die korrigierte Nettofluoreszenz-Ratio, die durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter SUR1-k.o.-B-Zellen von der Emission Fura-2-inkubierter SUR1-k.o.-B-Zellen berechnet wurde (s. Kap. 3.5.6). Um die funktionelle Aktivität der isolierten B-Zellen zu beurteilen, erfolgte von Minute 10 bis Minute 20 die Stimulation mit einem exogenen K^+ -Stimulus (49,5 mM). Ab Minute 30 bis Minute 60 wurde die Perfusion mit der Testsubstanz C2 in einer Konzentration von 100 μ M durchgeführt und von Minute 45 bis Minute 70 in Anwesenheit des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 fortgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 19 Fura-2-inkubierten und 19 schein-inkubierten SUR1-k.o.-B-Zellen, die in drei (A) Einzelerperimenten bzw. drei (B) Versuchszyklen ermittelt wurden. Die Signifikanz der Versuchsdaten wurden in einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Anova) unter Vorgabe eines Konfidenzintervalls von 95 % mit $p < 0,0265$ bestätigt.

In Relation zu den B-Zellen der NMRI-Albinomaus, deren Isolation ebenfalls nach dem Verfahren der Collagenase-Injektion in den *Ductus choledochus* durchgeführt wurde, war das basale $[Ca^{2+}]_i$ -Niveau der mit einem moderaten Glucose-Stimulus (10 mM) perfundierten B-Zellen durch einen auffällig gleichförmigen Verlauf gekennzeichnet. Unter diesen prästimulatorischen Bedingungen wurden divergente Ratio-Werte für die Nettofluoreszenz und die Bruttofluoreszenz registriert, die als gemeinsames Charakteristikum weder Fluktuationen noch Oszillationen des Signalprofils aufwiesen.

Bei diesen Experimenten verursachte die Interferenz zwischen der Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 und der endogenen Fluoreszenz des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenz-Ratio um 38 Einheiten (s. Abb. 4.3.2 (A)). Im Vergleich zu den unter Verwendung nativer B-Zellen der NMRI-Albinomaus ermittelten Versuchsdaten (s. Kap. 4.2.5.2), reagierte diese Signalkomponente ebenfalls resistent gegenüber Expositionen mit dem Antagonisten D600. Durch die Bildung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio (s. Kap. 3.5.6) konnte jedoch die vollständige Aufhebung der D600-resistenten Signalkomponente realisiert werden.

Hinsichtlich des D600-vermittelten Antagonismus führte das Korrekturverfahren zu einer sichtbaren Intensivierung der inhibitorischen Potenz. Der relative Standardfehler der während der K^+ -induzierten Depolarisation registrierten Fluoreszenz-Ratio wurde durch die Bildung der Nettofluoreszenz-Ratio geringfügig erhöht.

4.3.3 Gatifloxacin

Das Fluorchinolon Gatifloxacin induzierte in einer Konzentration von 100 μ M eine deutlich registrierbare Erhöhung der Fura-Fluoreszenz-Ratio (Minute 30 bis Minute 60), die sich nach einer Latenz von einer Minute mit einer schnellen Kinetik manifestierte. Die in dem Diagramm (B) dargestellten Mittelwerte dokumentieren die intensive Wirkung dieser ersten Phase, auf die eine zweite Phase geringerer Effizienz folgte. Der initiale prompte Anstieg setzte sich während dieser Periode mit einer geringeren Dynamik kontinuierlich fort und wurde durch die Anwesenheit des Antagonisten D600 (Minute 45) beendet. Das maximale Ausmaß, des mit 100 μ M der Testsubstanz zu erzielenden Effektes, entsprach nach einem Zeitraum von 15 Minuten einer Ratio von 54 Einheiten.

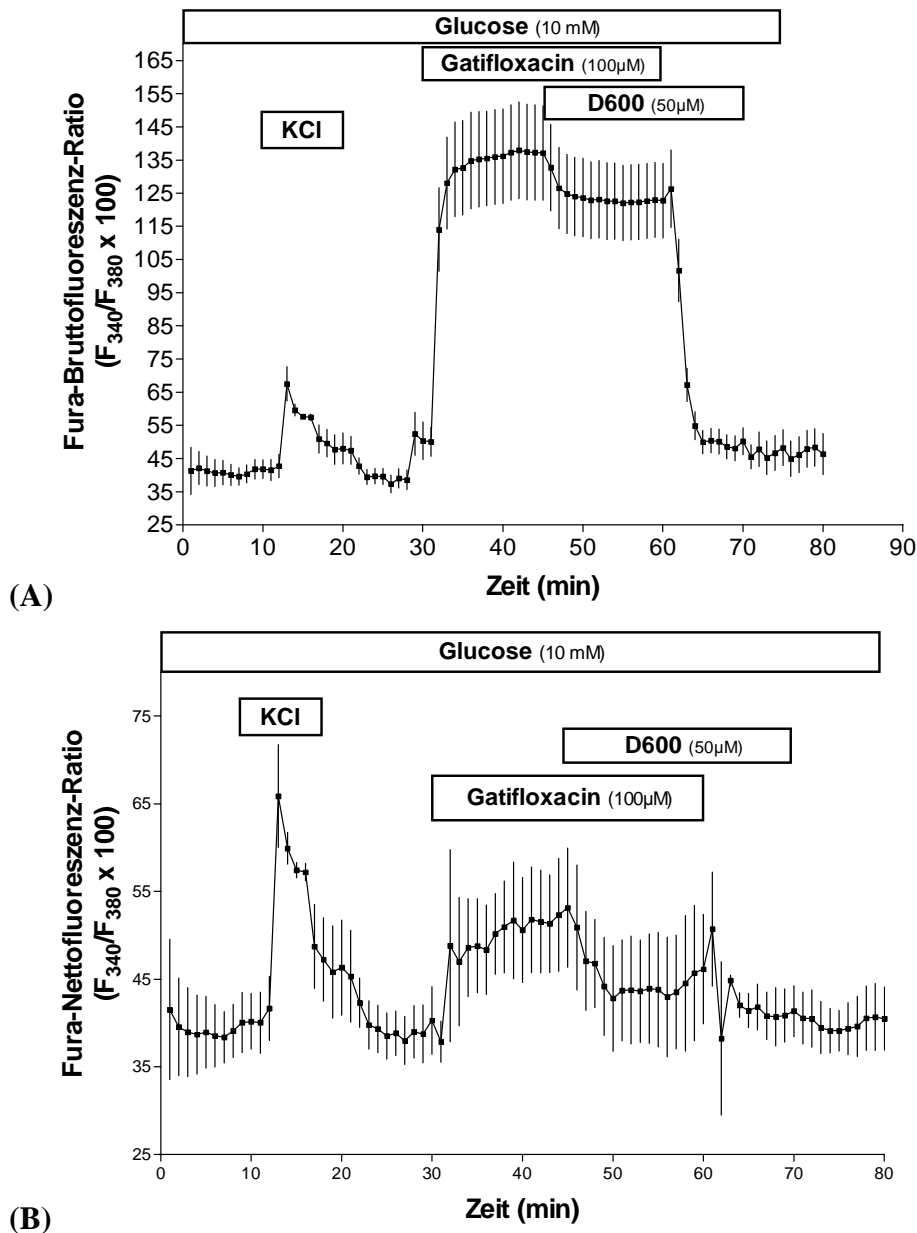


Abbildung 4.3.3.1 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wirkung des Fluorchinolons Gatifloxacin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen der SUR1-k.o.-Maus In dieser Versuchsreihe wurde die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration endokriner SUR1-k.o.-B-Zellen, die keinen funktionellen K_{ATP} -Kanal exprimieren, analysiert und in Abhängigkeit von der Zeit als Fura-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert. Die Resultate der unkorrigierten Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio, sind in (A) dargestellt. Die korrigierte Nettofluoreszenz-Ratio, repräsentiert durch die in (B) abgebildeten Werte, wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission scheininkubierten SUR1-k.o.-B-Zellen von derjenigen Fura-2-inkubierten SUR1-k.o.-B-Zellen errechnet (s. Kap. 3.5.6). Die funktionelle Integrität der isolierten Zellen wurde durch die Exposition mit einem externen K^+ -Stimulus (49,5 mM) von Minute 10 bis Minute 20 nachgewiesen. Ab Minute 30 bis Minute 60 erfolgte die Perifusion mit 100 μ M Gatifloxacin. Die Wirkung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonisten D600 auf den induzierten Effekt wurde von Minute 45 bis Minute 70 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von insgesamt 15 Fura-2-inkubierten und 17 scheininkubierten B-Zellen, die in drei Einzelerperimenten (A) bzw. drei Versuchszyklen (B) ermittelt wurden. Die Signifikanz der Nettofluoreszenz-Ratio wurde in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit $p < 0,0001$ belegt. Als Vertrauensbereich wurde ein Konfidenzintervall von 95 % vorgegeben.

Die Exposition der SUR1-*k.o.*-B-Zellen mit dem L-Typ-Ca²⁺-Kanal-Inhibitor D600 (Minute 45 bis Minute 70) verursachte eine unmittelbar einsetzende Reduktion der Fura-Fluoreszenz-Ratio um zehn Einheiten (Minute 50). Das basale Niveau der Fluoreszenz-Ratio wurde unter diesen Bedingungen nicht unterschritten.

Während des weiteren Verlaufs der Perifusionsmessung stabilisierte sich das Kurvenprofil auf einem konstanten *steady state*, der zwei Einheiten oberhalb des prästimulatorischen Bereiches lokalisiert war. Bereits vor dem Aussetzen des Fluorchinolon-Effektes (Minute 60) zeigte die Fluoreszenz-Ratio erneut eine geringfügig steigende Tendenz. Die Beendigung der Zell-Exposition mit dem Fluorchinolon (Minute 60) äußerte sich unter Berücksichtigung des artifiziell bedingten Signals, das mit einer schnellen Dynamik während des Medienwechsels registriert wurde, durch die Stabilisierung der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf einen nahezu konstanten Bereich, der im Mittelwert einer Nettofluoreszenz-Ratio von 44 Einheiten entsprach.

Der D600-vermittelte Antagonismus bewirkte in Abwesenheit des Fluorchinolons eine geringe Verminderung der Fluoreszenz-Ratio auf prästimulatorische Intensitäten, die vor der experimentellen K⁺-Depolarisation in dem Zytosol der SUR1-*k.o.*-B-Zellen herrschten. Der reversible Charakter der Fluorchinolon-induzierten [Ca²⁺]_i-modulierenden Wirkung offenbarte sich in Analogie zu den Effekten, die während der terminalen Versuchsphase von Minute 70 bis Minute 80 unter identischen Bedingungen in den B-Zellen der NMRI-Albinomaus analysiert wurden, durch die Egalisierung der Fluoreszenz-Ratio auf den ursprünglichen Basalbereich.

Die Exposition der K_{ATP}-Kanal-defizienten B-Zellen mit einer maximal depolarisierenden K⁺-Konzentration von 49,5 mM (Minute 10 bis Minute 20) induzierte innerhalb weniger Minuten einen deutlichen Anstieg der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration. Charakterisiert als Fura-Fluoreszenz-Ratio entsprach dies sowohl auf der Ebene der Bruttowerte als auch der Nettowerte einem Ausmaß von 65 Einheiten. Diese für funktionell intakte B-Zellen charakteristische Ansprechbarkeit auf eine K⁺-Depolarisation wurde durch das Korrekturverfahren nicht wesentlich beeinträchtigt. Demgemäß ließen sich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Skalierungen (s. Diagramme (A) und (B)) gleichwertige Muster und Kinetiken der K⁺-induzierten Depolarisation registrieren. Nach der Beendigung der K⁺-Exposition (Minute 20) wurden nach einer Latenz von drei Minuten die ursprünglichen bzw. prästimulatorischen Ca²⁺-Verhältnisse registriert.

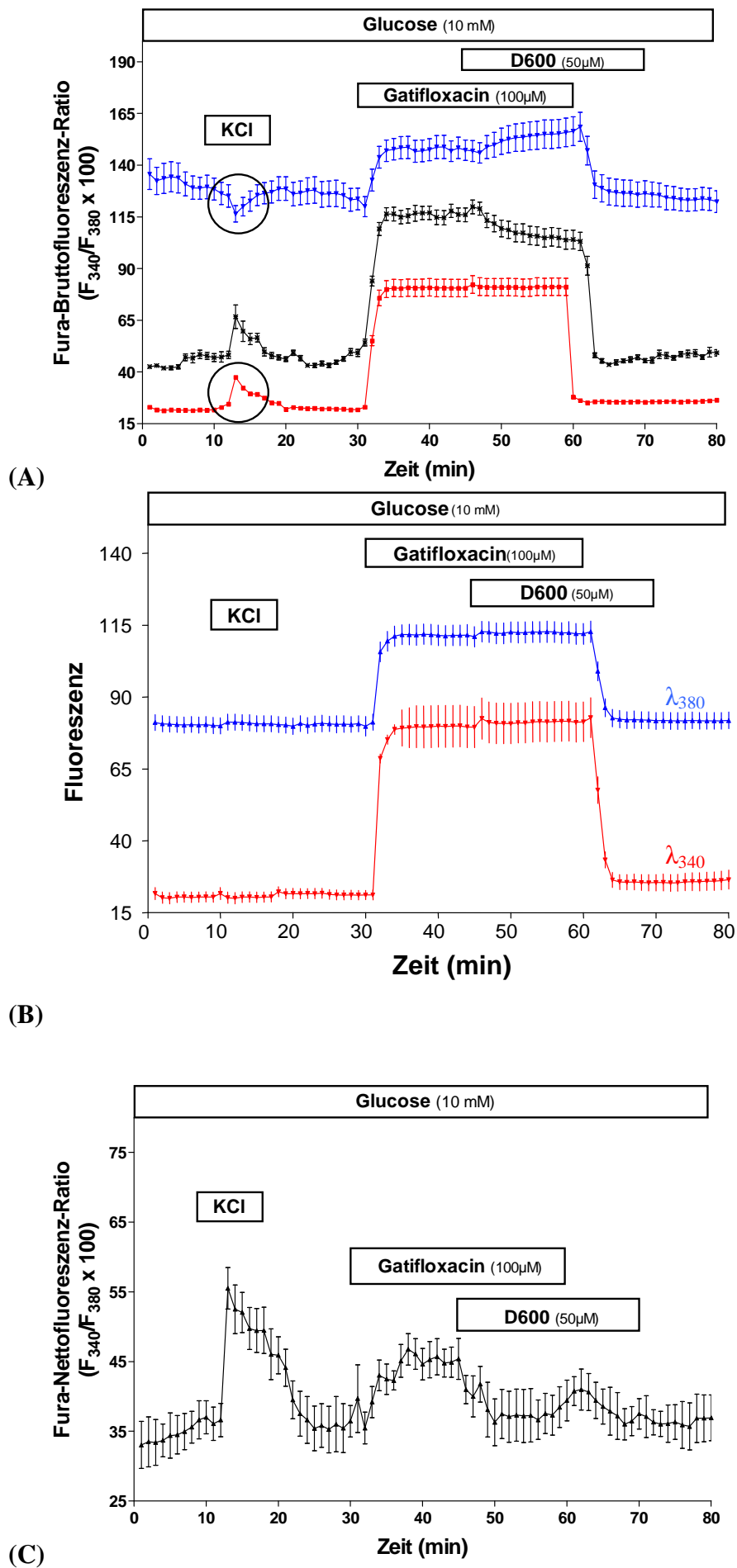
Eindrücklich waren bei diesen Perifusionsmessungen die intensiv ausgeprägten Fluktuationen des prästimulatorischen Basisniveaus, die auf eine erhöhte Aktivität der nach

dem direkten Collagenase-Injektions-Verfahren isolierten SUR1-k.o.-B-Zellen hindeuten. Demzufolge resultierte in Relation zu den Analysen der Fluorchinolone Lomefloxacin und C2 eine höhere Standardabweichung der registrierten Nettofluoreszenz-Ratio, deren \pm SEM-Werte eine ausgeprägtere Varianz der Einzelwerte von dem Mittelwert reflektieren.

Aufgrund dieser Beobachtungen und der prompten Kinetik der induzierten Effekte, ist die Beurteilung einer $[Ca^{2+}]_i$ -modulierenden Wirkung gegenüber den K_{ATP} -Kanal-defizienten B-Zellen nicht eindeutig zu beurteilen. Um den Einfluss artifizieller Faktoren, insbesondere durch die intrinsische Fluoreszenz des Fluorchinolons Gatifloxacin, auf die Versuchsdaten zu verifizieren, werden auf der folgenden Seite die Daten der endogenen Fluoreszenzemission, der Bruttofluoreszenz-Ratio und der korrespondierenden Nettofluoreszenz-Ratio explizit für einen der insgesamt drei durchgeführten Versuchzyklen vorgestellt (s. Abb. 4.3.3.2 (A) bis (C)).

Abbildung 4.3.3.2 K_{ATP} -Kanal-unabhängige Wirkung des Fluorchinolons Gatifloxacin gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration K_{ATP} -defizienter B-Zellen der SUR1-knock out-Maus

- (A) **Unkorrigierte Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio des Fluorchinolons Gatifloxacin** Die dargestellten Messwerte repräsentieren die unkorrigierte Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Bruttofluoreszenz-Ratio. Diese wurde während der Perifusion von acht Fura-2-inkubierten SUR1-k.o.-B-Zellen nach dem unter 4.3.3 beschriebenen Versuchsprotokoll über einen Zeitraum von 80 Minuten registriert. Dargestellt sind ebenfalls die Kurvenprofile der bei den Exzitationswellenlängen $\lambda_1 = 340$ nm (rot) und $\lambda_2 = 380$ nm (blau) angeregten und bei 510 nm registrierten Fluoreszenzemissionen sowohl des Indikators Fura-2 als auch des Fluorchinolons. Die dargestellten Versuchsdaten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM, die mit einer Frequenz von 1/min registriert wurden und von acht isolierten SUR1-k.o.-B-Zellen - entsprechend acht „regions of interest“ (ROIs) - berechnet wurden.
- (B) **Endogene Fluoreszenzemission des Fluorchinolons Gatifloxacin** Die Registrierung charakterisiert die endogene Fluoreszenzemission des Fluorchinolons Gatifloxacin, die bei einer Wellenlänge von 510 nm mit einer Frequenz von 1/min aufgenommen wurde. Die Exzitation der Testsubstanz erfolgte - wie bei dem Indikator Fura-2 - bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 340$ nm und $\lambda_2 = 380$ nm. Die Mittelwerte \pm SEM basieren auf den Ergebnissen, die während der Perifusion acht schein-inkubierter SUR1-k.o.-B-Zellen registriert wurden.
- (C) **Korrigierte Nettofluoreszenz-Ratio des Fluorchinolons Gatifloxacin** In dem Diagramm sind die korrigierten Werte der Fura-Fluoreszenz-Ratio, definiert als Fura-Nettofluoreszenz-Ratio, dargestellt. Diese wurde durch die Subtraktion der Fluoreszenzemission schein-inkubierter SUR1-k.o.-B-Zellen von der Emission Fura-2-inkubierter SUR1-k.o.-B-Zellen berechnet. Die Mittelwerte \pm SEM beziehen sich auf einen vollständigen Versuchszyklus, bestehend aus zwei Einzelperifusionen, in denen jeweils acht Fura-2-inkubierte und schein-inkubierte Einzelzellen nach dem gleichen experimentellen Protokoll analysiert wurden.



Die Intensität der von dem Fluorchinolon Gatifloxacin emittierten Fluoreszenzstrahlung zeichnete sich durch sehr konstante Werte aus, die durch die D600-vermittelte Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nicht beeinflusst wird (s. Abb. 4.3.3.2 (B)). Eine adäquate Fluoreszenzintensität wurde ebenfalls bei den Analysen der aus NMRI-Albinomäusen isolierten B-Zellen registriert. Demzufolge sind die Fluktuationen des Kurvenprofils nicht grundsätzlich auf Ca^{2+} -abhängige Variationen der endogenen Fluoreszenzemission zurückzuführen.

Der direkte Vergleich zwischen den Resultaten der in dem Diagramm (A) dargestellten Bruttofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.3.3.2) einer Einzelmessung mit den aus drei Versuchszyklen berechneten Mittelwerten (s. Abb. 4.3.3.1 (A)) verdeutlicht, dass das Ausmaß des D600-basierenden Antagonismus auf der Ebene der Einzelperfusion geringer ausgeprägt und die Ratio-Werte durch einen geringeren relativen Standardfehler gekennzeichnet sind. In Bezug auf die basalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Verhältnisse wurde unabhängig von der Anzahl der Versuchsdurchführungen ein konstantes Niveau von 40 Ratio-Einheiten ermittelt. Das Ausmaß der K^+ -Depolarisation stellte sich ebenfalls mit einer adäquaten Intensität dar, wobei sich das stufenförmige Muster sowohl bei der Einzelmessung als auch bei den Mittelwerten mit einer vergleichbaren Kinetik manifestierte.

In dem Diagramm (A) sind neben der Fura-Bruttofluoreszenz-Ratio die bei den Exzitationsmaxima $\lambda_1 = 340 \text{ nm}$ (rot dargestellt) und $\lambda_2 = 380 \text{ nm}$ (blau dargestellt) angeregten Fluoreszenzemissionen dokumentiert (s. Abb. 4.3.3.2). Entsprechend den Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzeigenschaften des Indikators Fura-2 (s. Kap. 3.5.1) führt die K^+ -evozierte Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von Minute 10 bis Minute 20 zu einer gegenläufigen Veränderung der emittierten Fluoreszenzintensitäten: die bei einer Wellenlänge von 340 nm angeregte Fluoreszenz zeigt den charakteristischen prompten Anstieg der Fluoreszenzintensität, während die bei 380 nm induzierte Fluoreszenzemission eine adäquate Reduktion der Strahlungsintensität aufweist. Dieser Prozess äußert sich auf der Ebene des Ratioing durch eine effiziente Steigerung der Bruttofluoreszenz-Ratio.

Als weitere Beobachtung verdeutlicht der Vergleich zwischen den bei 340 nm und 380 nm induzierten Bruttofluoreszenzen, dass die Exzitation der Fluorochrome mit der höherfrequenten Strahlung eine wesentlich intensivere Fluoreszenzemission verursacht. Der Intensitätsunterschied ist eine Konsequenz der endogenen Fluoreszenzeigenschaften des Fluorchinolons Gatifloxacin, dessen Exzitationsmaximum in dem höherfrequenten Spektralbereich bei 350 nm lokalisiert ist. Dementsprechend wirkt sich die Interferenz zwischen der endogenen Fluoreszenz und der Fura-2-emittierten Fluoreszenz bei der

Exzitationswellenlänge $\lambda_1 = 340$ nm wesentlich intensiver aus als bei der Exzitation mit der längerwelligen Strahlung ($\lambda_2 = 380$ nm). Dieses Phänomen stellt sich mit vergleichbarer Intensität bei der fluoreszenzmikroskopischen Charakterisierung der endogenen Fluoreszenzaktivität des Fluorchinolons Gatifloxacin (s. Abb. 4.3.3.2 (B)) dar, die basierend auf der sehr ähnlichen optischen Aktivität der Fluorchinolone für alle Testsubstanzen exemplarisch ist.

Die nach der Durchführung des Korrekturverfahrens (s. Kap. 3.5.6) resultierende Nettofluoreszenz-Ratio war sowohl bei dem Einzelexperiment als auch bei den aus mehreren Versuchszyklen berechneten Mittelwerten durch ausgeprägte Fluktuationen des Kurvenprofils gekennzeichnet (s. Abb. 4.3.3.2 (C)). In Relation zu den unkorrigierten Bruttowerten der Fura-Fluoreszenz-Ratio führte die Bildung der Nettofluoreszenz-Ratio zu einer Intensivierung der Fluktuationen sowie einer Erhöhung des relativen Standardfehlers, was unter anderem auf das größere Versuchskollektiv zurückzuführen ist.

Es lässt sich folgern, dass das unausgeglichene, fluktuierende Kurvenprofil der Nettofluoreszenz-Ratio nicht nur auf funktionelle Variabilitäten der nach dem direkten Collagenase-Injektions-Verfahren isolierten SUR1-*k.o.*-B-Zellen zurückzuführen ist, sondern ebenso durch das grundlegende Prinzip der Datenauswertung beeinflusst wird. Artificielle Faktoren scheinen hingegen nur geringfügig mit den korrigierten Werten der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio zu interferieren.

4.4 Depolarisierende Wirkung ausgewählter Fluorchinolonen auf das Membranpotential pankreatischer B-Zellen der NMRI-Albinomaus

Wird vorausgesetzt, dass die Steigerung der Insulinsekretion auf eine Hemmung der Aktivität des ATP-sensitiven K^+ -Kanals zurückzuführen ist, so muss sich nach dem gegenwärtig allgemein akzeptierten Konsensus („*triggering pathway*“) eine Depolarisation der Plasmamembran nachweisen lassen. Konkret bestand die Fragestellung darin, ob diejenigen Substanzen, die eine deutliche Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induzieren, ebenso in der Lage sind, eine ausgeprägte Depolarisation herbeizuführen. Darüber hinaus sollte ein Vergleich mit den Literaturdaten bezüglich der Inaktivierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals durch Fluorchinolone ermöglicht werden. Valide Daten lagen unter anderem für die Fluorchinolone Lomefloxacin und Gatifloxacin sowie das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 (Saraya et al., 2004; Zünkler und Wos, 2003; Zünkler et al., 2006) vor, die dementsprechend als Positivkontrollen fungieren konnten.

Da in dem *whole cell*-Modus der *patch clamp*-Technik der Energie-Metabolismus der Zellen durch das Auswaschen des Cytosols weitgehend unterbrochen ist, wurden die Versuche in Abwesenheit von Glucose durchgeführt. Die funktionelle Integrität der kultivierten B-Zellen wurde in der initialen Versuchsphase durch die Exposition mit dem Sulfonylharnstoff-Derivat Tolbutamid in einer nahezu maximal K_{ATP} -Kanal-inaktivierenden und implizit stark depolarisierenden Konzentration von 500 μM nachgewiesen. Der durch den Sulfonylharnstoff erzeugte Effekt diente gleichermaßen als interner Standard, um das Ausmaß und die Kinetik der von den jeweiligen Fluorchinolonen induzierten Depolarisation beurteilen zu können. Die Exposition mit 500 μM Tolbutamid induzierte innerhalb einer Minute eine effektive und nach Auswaschen vollständig reversible Depolarisation der Plasmamembran (s. Abb. 4.4.1 (A) und (D)). Dieses Ergebnis ist konform mit der bekannten schnellen Wirkkinetik dieser Substanz.

Die depolarisierende Wirkung der einzelnen Fluorchinolone wurde zunächst in einer Konzentration von 50 μM miteinander verglichen, da die Erwartung bestand, dass für viele Substanzen eine Konzentration von 100 μM bereits hinreichend ist, um eine maximal effektive Wirkung zu induzieren und deshalb keine Unterschiede mehr erkennbar sein würden. Das Ausmaß der depolarisierenden Effekte in einer Wirkkonzentration von 50 μM war jedoch oftmals nur mäßig ausgeprägt, so dass zusätzliche Versuche mit einer zweifach höheren Konzentration von 100 μM durchgeführt wurden. Zudem konnte auf diese Weise ein direkter Bezug zu den in einer anderen Arbeit ermittelten Sekretionsdaten hergestellt werden.

Verglichen mit Tolbutamid setzte die durch Fluorchinolone induzierte Depolarisation mit einer langsamen Kinetik ein, so dass in der Regel nach einem Zeitraum von sechs bis acht Minuten (s. Tab. 4.4.1) das mit einer Konzentration von 50 μM erzielbare Wirkungsmaximum erreicht wurde. Ein weiterer Unterschied zwischen der Tolbutamid- und der Fluorchinolon-induzierten Depolarisation zeigte sich in der Abwesenheit charakteristischer Aktionspotentiale (Abb. 4.4.1 (D)). Auffallend war ebenso, dass das Auswaschen der Fluorchinolone aus dem extrazellulären Medium lediglich zu einer langsamen und unvollständigen Repolarisation führte (Fluorchinolon C2, s. Abb. 4.4.1 (A)); häufiger noch war keinerlei Reversibilität der Effekte zu erkennen (Ciprofloxacin bzw. Moxifloxacin, s. Abb. 4.4.1 (B) und (C)). Hier verblieben die Werte in Abwesenheit der Testsubstanzen unverändert auf dem Niveau des depolarisierten Membranpotentials (s. Tab. 4.4.1), so dass von einer intrazellulären Akkumulation der Fluorchinolone oder einem irreversiblen Mechanismus auszugehen war.

Um letztere Hypothese zu prüfen, wurde nach einer hinreichend langen Auswaschphase die Exposition mit dem K_{ATP} -Kanal-Agonisten Diazoxid in einer Konzentration von 300 μM eingeleitet. Erstaunlicherweise blieb Diazoxid in dieser Situation ohne hyperpolarisierende Wirkung (s. *Abb. 4.4.1 (A) und (C)*); weder bei den effektiv wirksamen Fluorchinolonen, unter anderem Fluorchinolon C2, noch bei dem moderat depolarisierenden Fluorchinolon Moxifloxacin war eine Zunahme des Membranpotentials und eine damit einhergehende Repolarisation der Plasmamembran zu beobachten. Um strukturelle Defekte der B-Zellen bzw. deren Plasmamembran oder eine unspezifische Toxizität ausschließen zu können, wurde in einigen Versuchen in der terminalen Versuchsphase eine zusätzliche Depolarisation mit einer hohen extrazellulären K^+ -Konzentration durchgeführt. Diese verursachte regelmäßig die charakteristische, prompt einsetzende und reversible Depolarisation der Plasmamembran, die exemplarisch für das Fluorchinolon C2 in der *Abbildung 4.4.1 (A)* dargestellt ist. Des Weiteren wurden Kontrollversuche ohne Substanzzugabe bzw. in Anwesenheit des Lösungsvermittlers DMSO in einer Konzentration von 0,2 % durchgeführt. Unter diesen Bedingungen resultierte im Verlauf der Exposition lediglich eine geringfügige Verminderung des Membranpotentials um 2,5 mV (Daten nicht dargestellt).

Erwartungsgemäß war Lomefloxacin in einer Konzentration von 50 μM deutlich effektiver (Depolarisation von -67,8 mV auf -46,4 mV) als das Analogon Norfloxacin (Depolarisation von -72,4 auf -61,1 mV). Die Wirkungen der klinisch relevanten Fluorchinolone Gatifloxacin, Ciprofloxacin und Moxifloxacin wurden ebenfalls zunächst in einer Konzentration von 50 μM miteinander verglichen: Gatifloxacin und Ciprofloxacin induzierten ähnlich effektive Depolarisationen, die sich durch die Verringerung des Membranpotentials ausgehend von -73,8 mV auf -45,3 mV bzw. von -68,0 auf -42,6 mV äußerten. Moxifloxacin hingegen war durch eine geringe Effizienz gekennzeichnet (s. *Abb. 4.4.1 (C)*): nach einem Zeitraum von 7,5 min wurde das Ruhemembranpotential ausgehend von -73,4 mV nur unwesentlich reduziert - entsprechend einem Mittelwert von 3,6 mV. Wurde jedoch die Konzentration auf 100 μM erhöht, verringerte sich das Membranpotential im Mittel um weitere 14,8 mV. Demgegenüber führte eine adäquate Erhöhung der Konzentration des Fluorchinolons Ciprofloxacin lediglich zu einer marginalen weiteren Depolarisation (s. *Abb. 4.4.1 (B)*). In der Gesamtheit resultierte für die therapeutisch relevanten Fluorchinolone in einer Konzentration von 50 μM die folgende Effektivitäts-Reihenfolge:

Gatifloxacin > Ciprofloxacin > Lomefloxacin > Norfloxacin > Moxifloxacin

Das Ausmaß der depolarisierenden Effekte zeigte sich mit Ausnahme des Fluorchinolons Moxifloxacin unabhängig von der Konzentration, so dass die genannte Rangfolge für eine Fluorchinolon-Konzentration von 100 µM weiterhin Gültigkeit besaß:

Gatifloxacin > Ciprofloxacin > Lomefloxacin > Moxifloxacin > Norfloxacin

Die depolarisierende Wirkung der Fluorphenyl-substituierten Fluorchinolone C1 bis C4 induzierte deutliche Effekte. In einer Konzentration von 50 µM depolarisierten die congeneren Fluorchinolone C1, C2 und C3 die Plasmamembran um mehr als 20 mV. Das Struktur-Isomer C4 zeigte im Gegensatz dazu eine geringere Effizienz, die zu einer Reduktion des Membranpotentials um nahezu 12 mV führte (s. *Tab. 4.4.2*). In Analogie zu den therapeutisch genutzten Fluorchinolonen konnte bei diesen Derivaten das Ausmaß des Effektes in der Regel nicht durch die Erhöhung der Konzentrationen wesentlich gesteigert werden: In einer Konzentration von 100 µM führte die Substanz C1 zu einer zusätzlichen Depolarisation der Plasmamembran um 16 mV, während die Wirkungen des Isomers C2 sowie der desmethylierten Analoga C3 und C4 lediglich um 4 bis 6 mV gesteigert wurden. Die Effektivität der fluorphenylierten Fluorchinolone in einer Konzentration von 50 µM reduzierte sich in der folgenden Rangfolge:

$C2 > C1 = C3 \gg C4$.

Die Reihenfolge der depolarisierenden Potenz blieb ungeachtet der Konzentrations-Erhöhung auf 100 µM praktisch unverändert erhalten und entsprach unter diesen Bedingungen:

$C2 = C1 \gg C3 \gg C4$.

Zusammenfassend resultierte hinsichtlich der depolarisierenden Wirkung der untersuchten Fluorchinolone in einer Konzentration von 50 µM folgende Effektivitätsreihenfolge, in der sich der depolarisierende Mechanismus von einem stark ausgeprägten Effekt über eine moderate Wirkung bis hin zu einer marginalen Effizienz graduell verringert (s. auch *Tab. 4.4.2*):

Gatifloxacin > Fluorchinolon C2, Ciprofloxacin >
Lomefloxacin, Fluorchinolon C1 und C3
> Fluorchinolon C4, Norfloxacin > Moxifloxacin.

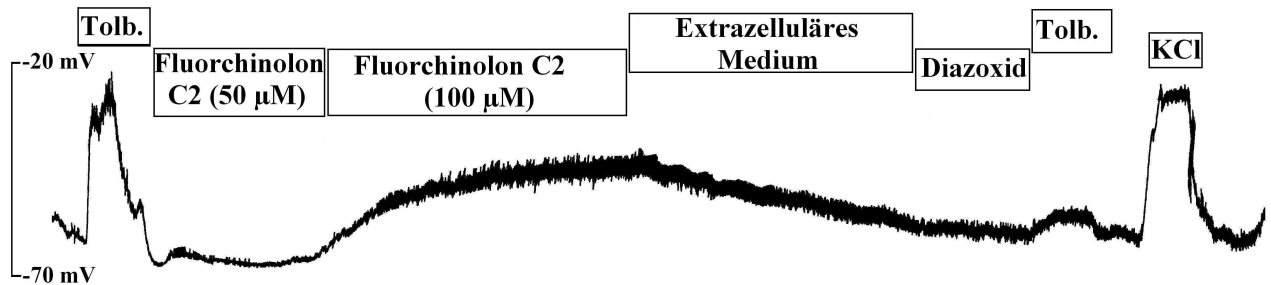


Abbildung 4.4.1 (A) Wirkung des Fluorchinolons C2 auf das Membranpotential isolierter und primär kultivierter B-Zellen des Mauspankreas Dargestellt ist die unter current clamp-Bedingungen in der whole cell-Konfiguration aufgenommene Originalregistrierung, die für weitere fünf Versuche repräsentativ ist. Vor der Exposition mit dem Fluorchinolon C2 (50 μ M bzw. 100 μ M) wurde die elektrische Aktivität der B-Zelle durch die Reaktion auf Tolbutamid in einer nahezu maximal wirksamen Konzentration (500 μ M) geprüft. Das Ausmaß der durch Tolbutamid (Tolb.) induzierten Depolarisation diente zudem als interner Standard, um den betazytotropen Effekt der Testsubstanz beurteilen zu können. Auffallend ist, dass trotz der partiellen Reversibilität der C2-induzierten Depolarisation der K_{ATP} -Kanal-Öffner Diazoxid (300 μ M) nicht zu einer Hyperpolarisation der isolierten B-Zelle führte. Der mangelnde Effekt der nachfolgenden Tolbutamid-Exposition könnte hingegen auf die Wirkung von Diazoxid zurückgeführt werden. Die prinzipielle Depolarisierbarkeit der B-Zellen wurde durch die Umströmung mit 40 mM KCl belegt.

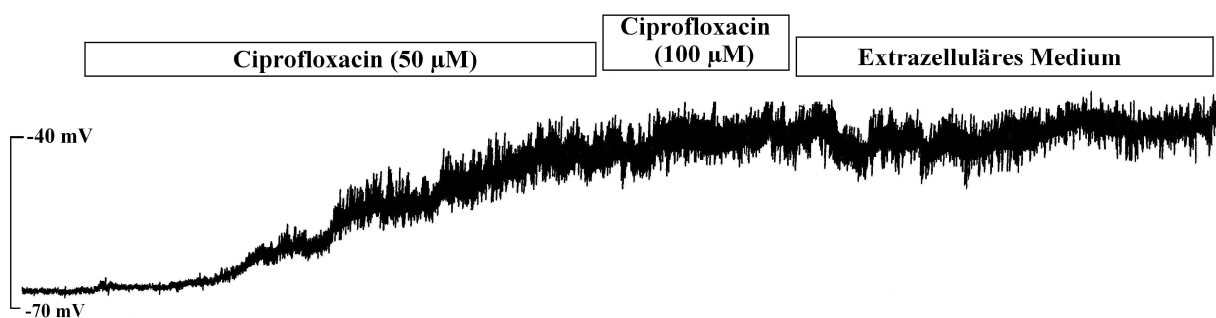


Abbildung 4.4.1 (B) Wirkung des Fluorchinolons Ciprofloxacin auf das Membranpotential isolierter und primär kultivierter B-Zellen des Mauspankreas Dargestellt ist die unter current clamp-Bedingungen in der whole cell-Konfiguration aufgenommene Originalregistrierung, die für weitere drei Einzelmessungen repräsentativ ist. Deutlich zu erkennen ist die Irreversibilität - zumindest im Zeitmaßstab dieser Versuche - der Ciprofloxacin-induzierten Depolarisation. Ebenso eindrücklich zeigt sich die langsame Kinetik des Effektes, dessen Ausmaß durch die Erhöhung der Konzentration von 50 μ M auf 100 μ M nicht gesteigert werden konnte.

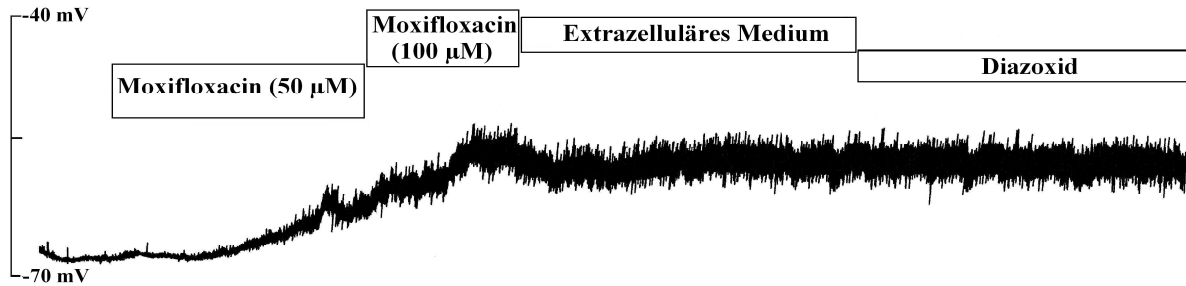


Abbildung 4.4.1 (C) Wirkung des Fluorchinolons Moxifloxacin auf das Membranpotential von isolierten und primär kultivierten B-Zellen des Mauspankreas Dargestellt ist die unter current clamp-Bedingungen in dem whole cell-Modus aufgenommene Originalregistrierung, die für weitere sechs Versuche exemplarisch ist. Die geringe Wirkung der Substanz in einer Konzentration von 50 µM konnte durch die Erhöhung der Konzentration auf 100 µM zusätzlich gesteigert werden. Wie für die meisten anderen Fluorchinolone festgestellt werden konnte, war auch bei diesem Derivat die Depolarisation durch das Auswaschen der Substanz nicht zu beenden. Unter diesen Bedingungen war der K_{ATP} -Kanal-Agonist Diazoxid (300 µM) nicht in der Lage, eine Repolarisation der B-Zellen zu bewirken.

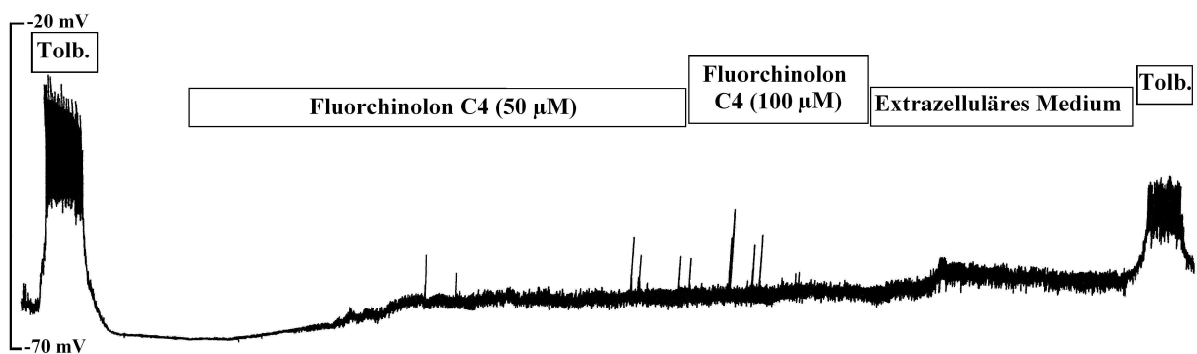


Abbildung 4.4.1 (D) Wirkung des Fluorchinolons C4 auf das Membranpotential isolierter und primär kultivierter B-Zellen des Mauspankreas Dargestellt ist die unter current clamp-Bedingungen in der whole cell-Konfiguration aufgenommene Originalregistrierung, die für weitere fünf Versuche repräsentativ ist. Vor sowie nach Beendigung der Exposition mit dem Fluorphenyl-Fluorchinolon C4 wurde die elektrische Aktivität der kultivierten Zelle durch die Stimulation mit 500 µM Tolbutamid (Tolb.) beurteilt. Die Ergebnisse der patch clamp-Messungen belegen die ineffiziente depolarisierende Wirkung der Testsubstanz.

Fluorchinolon [50 μ M]	Ruhemembran- potential [mV]	Maximale Depolarisation [mV]	Potential nach der Exposition [mV]	Zeitpunkt des max. Effektes (min)
Lomefloxacin	-67.8 ± 4.2 (n=7)	-46.4 ± 2.4 (n=7)	-42.8 ± 4.5 (n=4)	7 (n=7)
Norfloxacin	-72.4 ± 1.4 (n=7)	-61.0 ± 5.1 (n=7)	-59.0 ± 6.6 (n=7)	8 (n=7)
Gatifloxacin	-73.8 ± 2.9 (n=6)	-45.3 ± 5.6 (n=6)	-44.8 ± 7.8 (n=6)	7 (n=6)
Moxifloxacin	-73.4 ± 2.8 (n=7)	-70.8 ± 3.1 (n=7)	-68.8 ± 2.9 (n=5)	7,5 (n=7)
Ciprofloxacin	-68.0 ± 5.0 (n=4)	-42.6 ± 6.9 (n=4)	-38.88 ± 6.11 (n=4)	6 (n=4)
Fluorchinolon C1	-65.4 ± 4.3 (n=5)	-41.7 ± 3.9 (n=5)	-25.6 ± 6.1 (n=5)	6 (n=5)
Fluorchinolon C2	-73.9 ± 1.4 (n=6)	-46.2 ± 6.0 (n=6)	-51.2 ± 6.0 (n=4)	7 (n=6)
Fluorchinolon C3	-69.4 ± 2.8 (n=5)	-46.3 ± 9.7 (n=5)	-41.0 ± 7.2 (n=5)	8 (n=5)
Fluorchinolon C4	-67.6 ± 3.2 (n=6)	-55.8 ± 5.4 (n=6)	-58.7 ± 9.5 (n=4)	8 (n=6)

Tabelle 4.4.2 Wirkung ausgewählter Fluorchinolone auf das Membranpotential isolierter und kultivierter B-Zellen des Mauspankreas Angegeben sind die unter current clamp-Bedingungen in der whole cell-Konfiguration gemessenen Potentialdifferenzen, die entsprechend dem in den Abb. 4.4.1 (A) bzw. (D) dargestellten Versuchprotokoll analysiert wurden. Die in der Tabelle angegebenen Versuchsdaten beziehen sich auf eine Fluorchinolon-Konzentration von 50 μ M. Die Daten sind jeweils die arithmetischen Mittelwerte \pm SEM für n unabhängige Experimente. Zum Vergleich: Der Sulfonylharnstoff Tolbutamid depolarisierte in diesen Versuchen die B-Zellen ausgehend von einem Ruhepotential von -68.6 ± 2.4 auf einen Wert von -35.2 ± 5.7 (n = 4).

4.5 Korrelationen zwischen der betazytotropen bzw. insulinotropen Aktivität ausgewählter Fluorchinolone und der Molekülkonformation sowie dem elektrostatischen Potential

Korrelationen zwischen dem Ausmaß der Ca^{2+} -stimulierenden Effekte, dem depolarisierenden Potential und den stereochemischen Eigenschaften der untersuchten Fluorchinolone gestatten im Hinblick auf die mit einigen Vertretern assoziierten Störungen der Glucose-Homöostase die Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung. Für die Beurteilung eines derartigen Verhältnisses ist es sinnvoll, die Strukturen systematisch zu

variieren, so dass Zusammenhänge zwischen dem Ausmaß des zu beurteilenden Effektes und der Molekülgeometrie auf einer sicheren Grundlage beurteilt werden können. Unter diesem Gesichtspunkt wurde bei der Strukturvariation der Fokus auf dem basischen Heterozyklen bzw. dem Piperazyl-Motiv in der C7-Stellung sowie dem Substituenten an dem vinylogenen Amid-Stickstoff N1 gelegt. Gemäß diesen Überlegungen wurden die therapeutisch nicht verfügbaren, congeneren Fluorphenyl-Fluorchinolone C1, C2 und C4 sowie das unter der Bezeichnung Sarafloxacin veterinärmedizinisch eingesetzte Derivat C3 in die Untersuchungen einbezogen. Die Fluorchinolon-Derivate C1 und C2 bzw. C3 und C4 differenzieren sich lediglich durch die Positionierung des Fluoratoms an dem Phenyl-Ring, das sich in para- oder in ortho-Stellung befindet, und sind definitionsgemäß als Struktur- bzw. Konstitutions-Isomere aufzufassen. Bei den Isomeren C1 und C2 befinden sich zusätzlich zwei Methyl-Gruppen in der C3'- und C4'-Position des C7-Piperazyl-Motivs.

Um eine Beziehung zwischen der Wirkung der Fluorchinolone gegenüber den pankreatischen B-Zellen und der Molekülgeometrie herstellen zu können, wurden therapeutisch verfügbare Fluorchinolone in die Untersuchungen einbezogen. Verglichen wurden Inhibitoren des K_{ATP} -Kanals, *i.e.* Lomefloxacin, Gatifloxacin sowie das in der N1-Position o-fluorphenylierte Derivat C2, mit Fluorchinolonen, die im Rahmen von *in vitro*- und *in vivo*-Studien lediglich eine geringe Affinität zu dem Kanal gezeigt haben, unter anderem Norfloxacin (Saraya et al., 2004; Zünkler et al., 2006; Zünkler und Wos, 2003). Gleichmaßen wurden Fluorchinolone betrachtet, die bisher nicht mit wesentlichen Störungen der Glukose-Homöostase assoziiert wurden (Moxifloxacin). Ebenso wurden Fluorchinolon-Derivate berücksichtigt, die unter *in vitro*-Bedingungen keine wesentliche Steigerung der Insulinsekretionsrate induziert haben. Dabei handelte es sich im Einzelnen um Ciprofloxacin und die fluorphenylierten Struktur-Isomere C3 (Sarafloxacin) und C4 (Pflöger, Diplomarbeit 2006).

Basierend auf dieser Ausgangssituation wurden Pendants aus der Gruppe der betazytotropen bzw. insulinotropen Fluorchinolone und der Gruppe der gering wirksamen Derivate zusammengestellt, die hinsichtlich der strukturellen Eigenschaften nur geringfügige Variationen aufwiesen. Die stereochemischen Eigenschaften der Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin sowie Gatifloxacin und Moxifloxacin wurden zueinander in Relation gesetzt und auf Divergenzen untersucht. Als weiterer wichtiger Aspekt wurde die freie Rotation des heterocyklischen C7-Substituenten um die C7-N1'-Bindungsachse und die damit korrelierende Auswirkung auf die räumliche Ausdehnung des Moleküls durch Analysen des Konformationsraumes untersucht. Die Reaktivität der Fluorchinolone mit Proteinsystemen

oder anderen Strukturen des Mikro- und des Makroorganismus, die vorrangig durch die Elektronendichteverteilung bzw. Ladungsdichteverteilung determiniert wird, wurde durch die Berechnung des elektrostatischen Potential semiempirisch untersucht.

4.5.1 Berechnete Molekülgeometrien der Fluorchinolone

Die semiempirisch in der Gasphase und an dem absoluten Nullpunkt berechneten sowie optimierten Molekülgeometrien sind in den folgenden Abbildungen 4.5.1 (A) bis (C) dargestellt. In Anbetracht der Existenz chiraler Zentren in dem methylierten C7-Piperazyl-Motiv der Fluorchinolone Lomefloxacin und Gatifloxacin wurden die Berechnungen explizit für das S- und das R-Enantiomer durchgeführt. Bezüglich der sterischen Orientierung der Methyl-Gruppe an dem Piperazyl-Substituenten wurde sowohl die axiale als auch die equatoriale Ausrichtung vorgegeben und die energetisch begünstigte Konformation für weitere Betrachtungen herangezogen. Dementsprechend beziehen sich die dargestellten Molekülgeometrien aus Gründen der Vergleichbarkeit vorwiegend auf die axiale oder die equatoriale Ausrichtung der Methyl-Gruppe an dem Piperazyl-Substituenten, der jeweils in der energetisch stabilen Sesselkonformation vorliegt. Bei den unmethylierten Fluorchinolonen Norfloxacin, Ciprofloxacin und den Struktur-Isomeren C3 und C4 handelt es sich dagegen um achirale Moleküle. In Bezug auf die Konformationsanalyse (s. Kap. 3.7.3) wurden in der Regel für jedes Fluorchinolon zwei unterschiedlich stark ausgeprägte Energieminima registriert.

Die Ergebnisse der berechneten Molekülgeometrien und des elektrostatischen Potentials zeigen für die miteinander verglichenen Pendants deutliche Differenzen. Als wichtigster Unterschied weisen die in den experimentellen Untersuchungen betazytotrop wirksamen Derivate als gemeinsames Strukturmotiv eine einfache bzw. zweifache Methylierung der C7-Piperazyl-Gruppierung auf. Im Gegensatz dazu liegen bei den Fluorchinolonen mit gering effizienter Wirksamkeit sowohl gegenüber der Glucose-induzierten Insulinsekretion als auch der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration pankreatischer B-Zellen keine Methylgruppen vor. Dieses Strukturmotiv zeigt in Kombination mit dem C8-Substituenten einen Einfluss auf die Orientierung der von dem C7-Substituenten aufgespannten Ebene zu der Ringebene des 4-Chinolon-Grundgerüsts. Implizit wird die Rotationsfähigkeit der definierten Ebenen um die C7-N1'-Bindungsachse als auch das Ausmaß der räumlichen Ausdehnung des gesamten Fluorchinolon-Moleküls und die Planarität durch die Struktur-Komponenten in diesen beiden Positionen determiniert.

a) (Un)Methylierte und in der C8-Position methoxylierte Fluorchinolone:
Gatifloxacin und Moxifloxacin

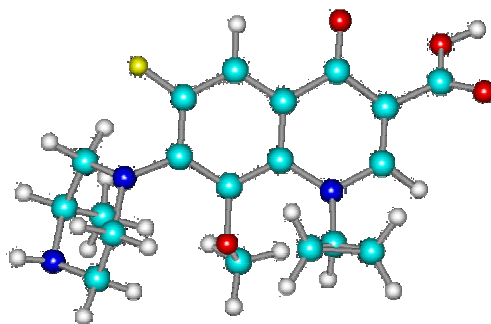


Abbildung 4.5.1 (1A) Molekülgeometrie des Fluorchinolons Gatifloxacin

Die mit der parametrischen Methode PM3 durchgeführte Berechnung der Molekülgeometrie bezieht sich auf die Gasphase und den absoluten Nullpunkt. Inter- und intramolekulare Wechselwirkungen oder Lösungsmittelleffekte wurden nicht berücksichtigt. Unter der Annahme, dass die Methyl-Gruppe des C7-Piperazyl-Substituenten axial angeordnet ist, wurde das thermodynamisch stabilste Konformer des Fluorchinolons bei einem Torsionswinkel – definiert durch die Atome C2'-N1'-C7-C8 - von 210° registriert.

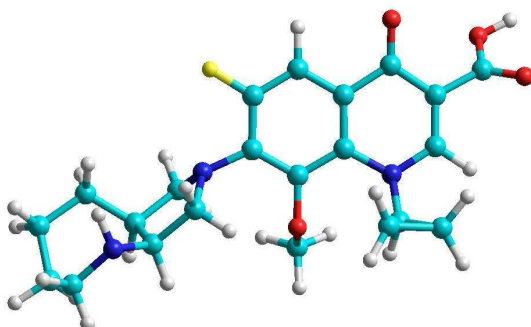


Abbildung 4.5.1 (2A) Molekülgeometrie des Fluorchinolons Moxifloxacin

Die semiempirisch berechnete und simulierte Molekülgeometrie (PM3) des Fluorchinolons Moxifloxacin bezieht sich auf dem absoluten Nullpunkt und den Bedingungen in der Gasphase. Intermolekulare Wechselwirkungen oder Interaktionen mit dem Lösungsmittel wurden dementsprechend nicht berücksichtigt. Zwei gleichwertige lokale Minimum existieren bei einer Rotation des C7-Substituenten von 100° und 310° um den Torsionswinkel C2'-N1'-C7-C8. Die dargestellte Molekülgeometrie repräsentiert das Konformer, das bei einer Rotation von 100° vorliegt.

b) *Einfach bzw. zweifach methylierte Fluorchinolone: Lomefloxacin und das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2*

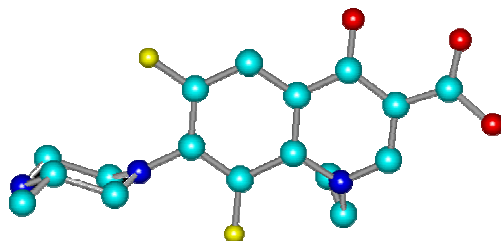


Abbildung 4.5.1 (1B) Molekülgeometrie des Fluorchinolons Lomefloxacin

Die in der Gasphase an dem absoluten Nullpunkt energetisch begünstigte Molekülgeometrie ist durch eine antiperiplanare Orientierung charakterisiert, bei der sich die methylierte C7-Piperazyl-Sequenz nahezu senkrecht zu der Ebene des 4-Chinolon-Grundgerüsts ausrichtet. Die equatoriale Stellung der sterisch anspruchsvollen Methyl-Gruppe sowie die Fluorierung der C8-Position korreliert mit einem von der C2'-N1'-C7-C8-Sequenz definierten Torsionswinkel von 220°.

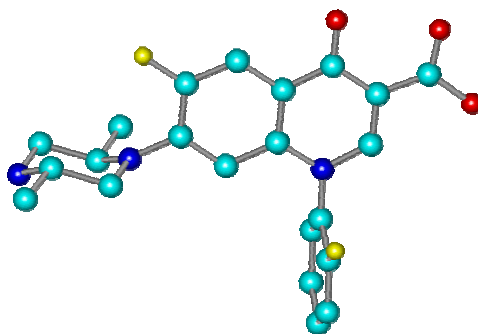


Abbildung 4.5.1 (2B) Molekülgeometrie des Fluorchinolons C2 Die auf semiempirische Berechnungen beruhende Molekülgeometrie verdeutlicht - ungeachtet der unsubstituierten C8-Position - eine antiperiplanare Orientierung des C7-Piperazyl-Substituenten zu dem Fluorchinolon-Grundgerüst. Die equatoriale Positionierung der beiden sterisch anspruchsvollen Methyl-Gruppen verursacht eine weitreichende Rotation des C7-Substituenten um die N1'-C7-Bindungsachse von 280°. Die Berechnung und Simulation der thermodynamisch stabilen Konformation bezieht sich auf die Bedingungen, die in der Gasphase an dem absoluten Nullpunkt herrschen.

c) *Unmethylierte Fluorchinolone: Norfloxacin und das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4*

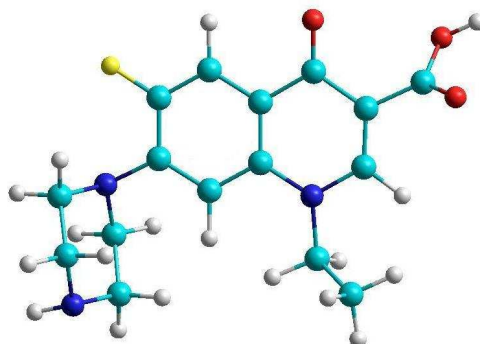


Abbildung 4.5.1 (1C) Molekülgeometrie des Fluorchinolons Norfloxacin Die mit der parametrischen Methode PM3 berechnete Molekülgeometrie des Fluorchinolons ist aufgrund der sehr ähnlichen räumlichen Orientierung exemplarisch für die Fluorchinolone C4 (s. Abb. 3.7.2) und Ciprofloxacin. Das Substitutionsprofil variiert lediglich in der N1-Position, deren Modifizierung weder einen Einfluss auf die Ausrichtung der Molekülachse noch auf die Rotation des C7-Substituenten um die N1'-C7-Bindungsachse ausübt. Die energetisch stabilste Konformation ist sowohl bei dem o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C4 als auch bei Norfloxacin bei einem geringen Torsionswinkel von 90° bzw. 80° lokalisiert. Bezüglich des Fluorchinolons C4 existiert ein zweites Minimum bei einem Torsionswinkel von 50°. Die Ergebnisse der Konformationsanalyse als auch der berechneten Molekülgeometrie beziehen sich auf Bedingungen, die an dem absoluten Nullpunkt in der Gasphase vorherrschen.

Die Resultate der Konformationsanalyse deuten daraufhin, dass die vertikale Ausrichtung der voluminösen Methylgruppen zu der Ebene des Grundgerüsts mit einer erheblichen thermodynamischen Stabilisierung der Molekülgeometrie einhergeht (s. Kap. 4.5.2). Bezogen auf die Rotation des C7-Piperazyl-Ringes um die C7-N1'-Achse zu der Ebene des 4-Chinolon-Grundgerüsts entspricht dies einem Torsionswinkel von 280° für das Fluorchinolon C2 (s. Abb. 4.5.1 (2B)), 210° für Gatifloxacin (s. Abb. 4.5.1 (1A)) und 220° für Lomefloxacin (s. Abb. 4.5.1 (1B)). Diese Ergebnisse lassen - unter Berücksichtigung der für Moxifloxacin ermittelten Energieminima (100° und 310°) - darauf schließen, dass die zusätzliche Substitution der C8-Position mit einer Methoxy-Gruppe (Gatifloxacin) bzw. einem weiteren Fluoratom (Lomefloxacin) das Ausmaß der Torsion aus der Ringebene deutlich erhöht. In der Konsequenz orientiert sich die von dem C7-Substituenten aufgespannte Ebene außerhalb der Ebene des planaren Grundkörpers, so dass im weitesten Sinne eine clinale bzw. eklyptische Konformation resultiert. Im Rahmen von Röntgenstrahlstrukturanalysen und Simulationen der Molekülgeometrie konnte ein derartiger Einfluss des C8-

Substituenten auf das Ausmaß der Torsion um die N1'-C7-Bindung nachgewiesen werden (Mizuki et al., 1996). Das fehlende Methylmotiv bei den Fluorchinolonen Norfloxacin und den Isomeren C3 und C4 (s. *Abb. 4.5.1 (1C)*) korreliert mit einer wesentlich geringer ausgeprägten Torsion des C7-Substituenten um die N1'-C7-Achse. Die thermodynamisch begünstigten Konformere der genannten Fluorchinolone korrespondieren mit einem Rotationswinkel von 80° (Norfloxacin, C3) bzw. 50° und 90° (C4). Ein ähnliches Ergebnis wurde in der von Mizuki et al. durchgeführten Studie für das Fluorchinolon Norfloxacin ermittelt (Mizuki et al., 1996). Bedingt durch die Anwendung eines anderen semiempirischen Berechnungsverfahrens (AM1, Programm MOPAC, Version 5.0) resultieren hinsichtlich der ermittelten Rotationswinkel geringfügige Abweichungen (49° versus 80°). Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass die thermodynamische Stabilisierung der unmethylierten Fluorchinolon-Derivate Norfloxacin, C3 und C4 eine geringgradige Rotation des C7-Piperazyl-Substituenten um die N1'-C7-Bindungsachse aus der Ebene des Grundgerüsts erfordert. Dementsprechend sind die stereochemischen Eigenschaften bzw. die Molekülgeometrien der Substanzen durch eine symmetrische Orientierung des Piperazyl-Motivs entlang der Molekülachse und einem geringen Raumbedarf charakterisiert. Vergleichbare stereochemische Verhältnisse konnten ebenfalls für das unmethylierte Fluorchinolon Ciprofloxacin analysiert werden.

4.5.2 Strukturvergleich zwischen den methylierten bzw. unmethylierten Fluorchinolonen in der jeweils energetisch begünstigten Konformation

Die Überlagerung der Moleküle in der jeweils energetisch stabilsten Konformation verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Substitutionsprofil und der daraus resultierenden Molekülgeometrie sowie dem Ausmaß der sterischen Ausdehnung.

a) *Überlagerungen der betazytotropen Fluorchinolon-Derivate Lomefloxacin, Gatifloxacin und C2*

Die sehr ähnliche Stereochemie bzw. Molekülgeometrie der methylierten Derivate Lomefloxacin und Gatifloxacin äußert sich durch einen erhöhten Raumbedarf des C7-Substituenten oberhalb der Ringebene, während sich das Ethyl- bzw. Cyclopropyl-Motiv in der N1-Stellung unterhalb der Ebene orientiert (s. *Abb. 4.5.2 (1A)*). Die Überlagerung verdeutlicht die Auswirkung einer zusätzlichen Modifizierung der C8-Position, die zu einer ausgeprägten Torsion des C7-Substituenten aus der Ebene des planaren Fluorchinolon-Grundgerüsts führt.

Dementsprechend sind die thermodynamisch begünstigten Konformere der beiden Fluorchinolone bei einem Rotationswinkel von 220° bzw. 210° lokalisiert.

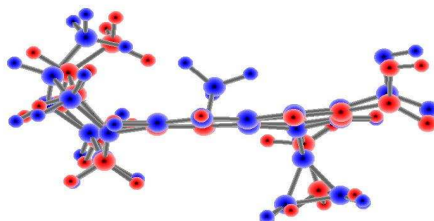


Abbildung 4.5.2 (1A) Überlagerung der Fluorchinolone Lomefloxacin und Gatifloxacin Die Projektion der optimierten Molekülgeometrien der methylierten und in der C8-Position substituierten Fluorchinolone Lomefloxacin (rot dargestellt) und Gatifloxacin (blau dargestellt) in einer Ebene verdeutlicht die sehr ähnlichen Molekülgeometrien. Die vertikale Ausrichtung des methylierten Piperazyl-Substituenten zu der Längsachse des Moleküls führt zu einem erhöhten Raumbedarf. Ebenso verdeutlicht sich in der dargestellten Überlagerung die Torsion der von der C7-Komponente aufgespannten Ebene aus der Ringebene des Grundgerüsts, die bei Lomefloxacin mit einem Rotationswinkel von 220° und bei Gatifloxacin von 210° korrespondiert.

Der Vergleich zwischen den thermodynamisch begünstigten Konformere der betazytotropen Fluorchinolone C2 und Gatifloxacin dokumentiert die umfangreiche sterische Ausdehnung des symmetrisch methylierten bzw. einfach methylierten C7-Piperazyl-Substituenten (s. Abb. 4.5.2 (2A)). Die von dem Piperazyl-Ring aufgespannte Ebene orientiert sich vertikal zu der Ebene des Fluorchinolon-Grundkörpers, so dass eine asymmetrische Ausrichtung zu der Molekülachse resultiert.

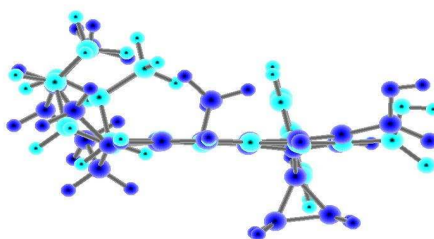


Abbildung 4.5.2 (2A) Überlagerung der Fluorchinolone C2 und Gatifloxacin Bedingt durch die axiale Position der Methyl-Gruppe liegt eine erhöhte Torsionsspannung in den Molekülen vor. Die energetisch stabilste Konformation erfordert daher eine weitreichende Rotation des methylierten C7-Piperazyl-Substituenten aus der Ebene des Fluorchinolon-Grundgerüsts. Dadurch werden Spannungen innerhalb des Moleküls und Wechselwirkungen zwischen den Substituenten verringert. Die zu den Minima korrespondierenden Konformationen sind durch einen Torsionswinkel von 280° (Fluorchinolone C2, hellblau dargestellt) bzw. 210° (Gatifloxacin, blau dargestellt) charakterisiert.

b) Überlagerungen der gegenüber den pankreatischen B-Zellen gering effektiven Fluorchinolone C4 und Moxifloxacin mit dem Fluorchinolon Norfloxacin

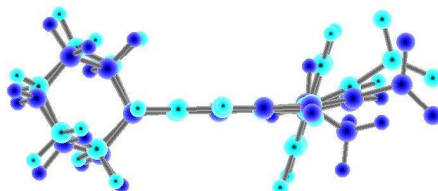


Abbildung 4.5.2 (1B) Überlagerung der Fluorchinolone C4 und Norfloxacin

Die Abwesenheit der Methyl-Substituenten als auch die unmodifizierte C8-Position äußert sich bei beiden Derivaten durch eine nahezu homologe Molekülgeometrie. Die Darstellung verdeutlicht die symmetrische Orientierung der C7-Substituenten zu der Molekülachse, die nur einen geringen Raumbedarf aufweist. Die thermodynamisch stabilsten Konformere korrespondieren bei beiden Derivaten mit einer geringgradigen Torsion des C7-Piperazyl-Substituenten um die C7-N1'-Bindungsachse – entsprechend einem Rotationswinkel von 80° (Norfloxacin) bzw. 90° (Fluorchinolon C4). Sowohl für das Fluorchinolon Norfloxacin sowie das o-fluorphenylierte Derivate C4 wurde eine antiplanare Orientierung berechnet, bei der sich der C7-Piperazyl-Substituent vertikal zu der Ebene des Fluorchinolon-Grundgerüsts ausrichtet.

Die Projektion der Molekülstrukturen der gering betazytotrop wirksamen Fluorchinolone C4 und Norfloxacin, die als gemeinsames Kennzeichen einen unmethylierten C7-Piperazyl-Substituenten aufweisen, dokumentiert die limitierte sterische Ausdehnung (s. Abb. 4.5.2 (1B)). Hervorzuheben ist die symmetrische Orientierung dieser Strukturkomponente entlang der Molekülachse.

Im Bezug auf das sehr heterogene Substitutionsprofil der Fluorchinolone Norfloxacin und Moxifloxacin ist die Überlagerung der Molekülgeometrien in der thermodynamisch stabilsten Konformation in geringerem Maße durch homologe räumliche bzw. stereochemische Verhältnisse gekennzeichnet. Die Darstellung verdeutlicht jedoch die sehr ähnliche Orientierung der Carboxyl-Carbonyl-Sequenz sowie der C7-Substituenten, die sich sowohl bei Moxifloxacin als auch Norfloxacin in der Ebene der Moleküllängsachse ausrichten. Dementsprechend resultiert im Gegensatz zu Gatifloxacin und Lomefloxacin eine geringe sterische Ausdehnung der C7-Substituenten vertikal zu der Ringebene des Grundkörpers (s. Abb. 4.5.2 (2B)).

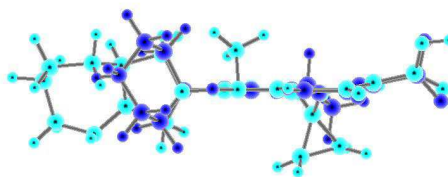


Abbildung 4.5.2 (2B) Überlagerung der Fluorchinolone Moxifloxacin und Norfloxacin Die Abwesenheit der Methyl-Substituenten bedingt eine sterisch anspruchslose Molekülgeometrie, für die eine geringe räumliche Ausdehnung des C7-Substituenten kennzeichnend ist. Die thermodynamische Stabilisierung erfordert bei beiden Derivaten eine geringgradige Torsion des C7-Piperazyl-Substituenten um die C7-N1'-Bindungsachse. Dementsprechend wurde sowohl für das Fluorchinolon Norfloxacin (80°) als auch das methoxylierte Fluorchinolon Moxifloxacin (100°) eine antiplanare Orientierung des heterozyklischen, unmethylierten C7-Restes zu der Ebene des 4-Chinolon-Grundkörpers berechnet.

c) Überlagerungen der betazytotropen Fluorchinolone C2 und Gatifloxacin mit den gering effektiven Fluorchinolonen C4 und Moxifloxacin

Um die divergenten sterischen Verhältnisse, die in der optimierten Molekülgeometrie der biologisch wirksamen Fluorchinolone C2, Lomefloxacin und Gatifloxacin herrschen, mit den räumlichen Anforderungen der ineffektiv bis gering wirksamen Derivate Norfloxacin, C3, C4 und Moxifloxacin zu vergleichen, wurden exemplarisch die Struktur-Analoga C2 und C4 bzw. Gatifloxacin und Moxifloxacin in der jeweils thermodynamisch stabilsten Konformation in einer Ebene übereinander projiziert (s. Abb. 4.5.2 (1C) und (2C)).

Die axial orientierten Methylgruppen der Fluorchinolone C2 und Gatifloxacin führen durch die senkrechte Ausrichtung oberhalb der Ringebene des Fluorchinolon-Grundkörpers zu einem erhöhten Raumbedarf. Demgegenüber sind die unmethylierten Pendants C4 und Moxifloxacin aufgrund der sterisch anspruchslosen Orientierung des C7-Substituenten innerhalb der Längsachse des Moleküls durch eine geringe räumliche Ausdehnung gekennzeichnet.

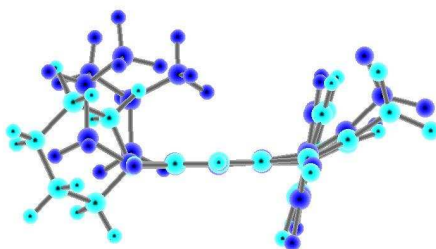


Abbildung 4.5.2 (1C) Überlagerung der Fluorchinolone C4 und C2 Die Überlagerung der optimierten Molekülgeometrien der Struktur-Analoga C2 (dunkelblau) und C4 (hellblau) verdeutlicht den erhöhten Raumbedarf des Fluorchinolons C2, für den die Methylierung des C7-Piperazyl-Substituenten ursächlich ist. Wahrnehmbar ist ebenso der divergente Rotationsgrad des C7-Substituenten aus der von dem Grundgerüst aufgespannten Ebene. Während die thermodynamische Stabilisierung bei dem Fluorchinolon C2 eine Rotation um 280° erfordert, korreliert die antiplanare Ausrichtung der unmethylierten Piperazin-Sequenz des Analogons C4 mit einem Rotationswinkel von 50° bzw. 90° . In der Darstellung wird die orthogonale Stellung- entsprechend einem Winkel von ungefähr 90° - des p-Fluorphenyl- bzw. o-Fluorphenyl-Substituenten zu der Ringebene deutlich, die bei den Fluorchinolonen C1 bis C4 unabhängig von der Stellung des Fluoratoms an dem Phenyl-Ring streng eingehalten wird.

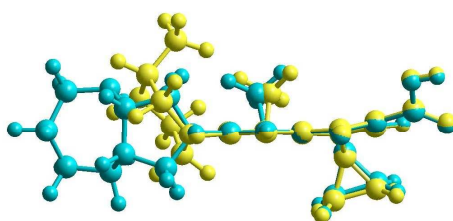


Abbildung 4.5.2 (2C) Überlagerung der Fluorchinolone Moxifloxacin und Gatifloxacin in der energetisch stabilsten Konformation Bedingt durch die axiale Position der Methyl-Gruppen an dem C7-Piperazyl-Motiv liegt eine erhöhte Torsionsspannung bei dem Fluorchinolon Gatifloxacin (gelb dargestellt) vor. Dies äußert sich durch eine im Vergleich zu Moxifloxacin (hellblau dargestellt) gesteigerte Rotation der voluminösen C7-Sequenz aus der Ebene des Grundgerüsts (210° versus 100°), um thermodynamische Stabilisierung zu erreichen. Der Vergleich zwischen den Struktur-Analoga verdeutlicht, dass die Molekülstruktur des Fluorchinolons Moxifloxacin in einer bevorzugt gering voluminösen Ausrichtung innerhalb der Molekülachse vorliegt, wohingegen Gatifloxacin durch einen erhöhten Raumbedarf gekennzeichnet ist.

Als grundlegender Unterschied zwischen der Molekülgeometrie der Analoga Gatifloxacin und Moxifloxacin wird aus der Darstellung ersichtlich, dass die Methyl-Gruppe des C7-Piperazyl-Motivs eine weit reichende räumliche Ausdehnung des Fluorchinolons Gatifloxacin verursacht (s. *Abb. 4.5.2 (2C)*). Im Gegensatz dazu führt die Abwesenheit einer sterisch anspruchsvollen Methyl-Gruppe an dem 6*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-Substituenten des Fluorchinolons Moxifloxacin und die damit korrelierende Orientierung des C7-Substituenten innerhalb der Molekülachse zu einem geringen Raumbedarf. In Bezug auf die Methoxylierung der C8-Position, einem gemeinsamen Struktur-Motiv der Fluorchinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin, begründet sich der gesteigerte Torsionsgrad des methylierten C7-Piperazyl-Motivs um die C7-N1'-Bindungsachse durch die vertikale Orientierung der Methoxy-Gruppe (s. *Abb. 4.5.2 (1C)*). Dieser erhöhte Raumbedarf bedingt bei Gatifloxacin eine Rotation um 210°, während das unmethylierte Analogon bei einem Torsionswinkel von 100° in der energieärmsten Konformation vorliegt.

4.5.3 Elektrostatisches Potential der Fluorchinolone

Die Darstellung des molekularen elektrostatischen Potentials (MEP) auf der Moleküloberfläche (Van-der-Waals-Oberfläche) charakterisiert das Potential, das als Reaktion auf eine positive Probeladung resultiert, die über die Moleküloberfläche geführt wird. Diese induziert in Abhängigkeit von den elektronischen Eigenschaften der einzelnen Strukturkomponenten Bereiche erhöhter elektrostatischer Abstoßung oder Anziehung. In Relation zu der positiven Probeladung werden Bereiche geringer Elektronendichte bzw. elektrostatischer Abstoßung durch grün dargestellte Flächen auf der Oberfläche repräsentiert. Bereiche, in denen aufgrund einer erhöhten Elektronendichte elektrostatische Anziehungskräfte herrschen, werden durch violett gefärbte Regionen auf der Van-der-Waals-Oberfläche abgebildet. Die Darstellung des mit der Ladungsdichte korrespondierenden elektrostatischen Potentials erfolgte als „3*D-mapped-isosurface*“ (s. Kap. 3.7.4).

Die Abbildung des elektrostatischen Potentials auf der dreidimensionalen Van der Waals-Oberfläche der jeweiligen Molekülsysteme verdeutlicht, dass die Elektronendichteverteilung durch das Substitutionsprofil in der N1-, C7- und C8-Position moduliert wird. Diese Positionen können weit reichenden Modifizierungen unterzogen werden, ohne die bakteriziden Eigenschaften aufzuheben (Mitscher, 2005). Der Vergleich zwischen den Struktur-Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin sowie den Strukturisomeren C2 und C4 dokumentiert die divergenten elektrostatischen Verhältnisse, die in den Molekülbereichen der N1-, C7- und C8-Positionen herrschen (s. *Abb. 4.5.3*).

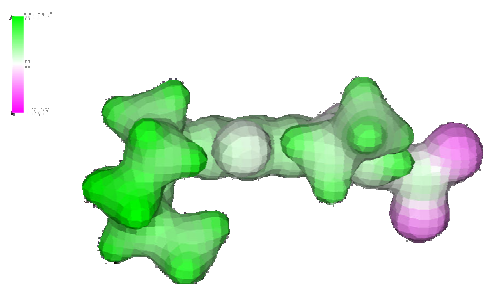
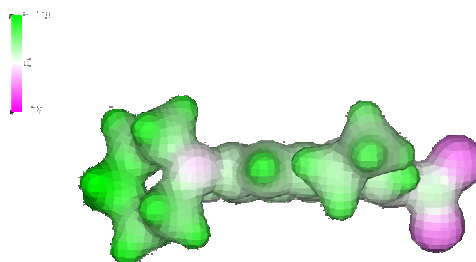


Abb.4.5.3 (A) Lomefloxacin



Norfloxacin

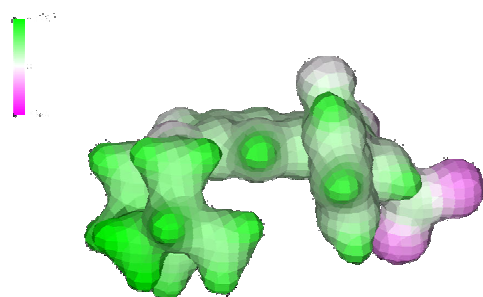
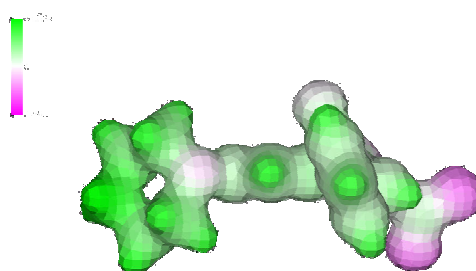


Abb.4.5.3 (B) o-Fluorphenyl-Fluorchinolone C2



o-Fluorphenyl-Fluorchinolone C4

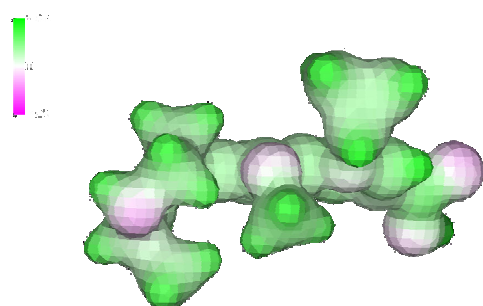
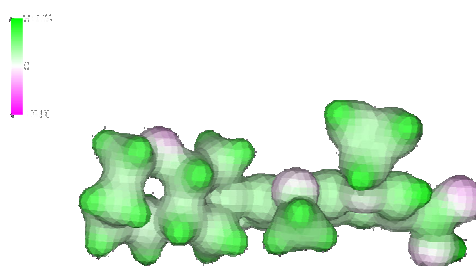


Abb. 4.5.3 (C) Gatifloxacin



Moxifloxacin

Abbildung 4.5.3 Molekulares elektrostatisches Potential (MEP) ausgewählter Fluorchinolone Die Molekülgeometrien der betazytotropen Fluorchinolone Lomefloxacin (A), Gatifloxacin (C) und C2 (B) sind in der energetisch begünstigten Konformation dargestellt und leiten sich von den axialen Isomeren ab. Die thermodynamisch stabilste Molekülkonformation der jeweils gering wirksamen bis ineffizienten Fluorchinolone Norfloxacin (A), Moxifloxacin (C) und C4 (B) ist dem methylierten Analogon gegenübergestellt. Das elektrostatische Potential wird auf der Moleküloberfläche abgebildet und charakterisiert die Elektronendichteverteilung bzw. Ladungsdichteverteilung. In Bezug zu einer positiven Probeladung, die über die Van-der-Waals-Oberfläche des Moleküls geführt wird, werden Abstoßungskräfte unterschiedlicher Intensität durch variable Grünnuancen repräsentiert. Diesen sind jeweils positive Werte zugeordnet. Die Bereiche variabler Violettstufungen kennzeichnen Gebiete elektrostatischer Anziehungskräfte, deren Ausmaß durch negative Werte charakterisiert wird.

Ursächlich sind in erster Linie die Methylierungen der C7-Substituenten, die mit einer erhöhten elektrostatischen Abstoßung korrelieren, sowie die variable Substitution der C8-Position (-H, -F, -OCH₃). Eine ähnliche Situation resultiert bei einem Vergleich zwischen den fluorphenylierten Isomeren C1 und C2 bzw. C3 und C4, die aufgrund der unterschiedlichen Position des Fluoratoms an dem N1-Phenyl-Substituenten in diesem Bereich divergente elektrostatische Eigenschaften aufweisen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Stellung des Fluoratoms an dem Phenyl-Ring Auswirkungen auf das Ausmaß der Proteinbindung ausübt. Die meta-Stellung korreliert mit einer deutlich höheren Proteinbindung (~60 %), wohingegen die para- und ortho-Stellung mit einer vergleichbar geringen Proteinbindung von durchschnittlich 32 % einhergeht (Holzgrabe, 1999).

Aufgrund der identischen Substitutionsprofile in der C3-, C4- und C6-Position herrschen in der oberen Molekülsphäre vergleichbare elektrostatische Verhältnisse bzw. Elektronendichteverteilungen. Untersuchungen des molekularen elektrostatischen Potentials, die auf der semiempirischen Methode AM1 basieren, haben gezeigt, dass die Konformation der Carboxyl-Funktion zu der Carbonyl-Gruppe des 4-Chinolon-Ringsystems durch die intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carbonyl-Sauerstoff diktiert wird. Als weiteres Ergebnis wurde offensichtlich, dass das terminale Stickstoffatom des Piperazyl-Substituenten elektrostatische Wechselwirkungen mit der Carbonyl-Carboxyl-Sequenz benachbarter Moleküle eingeht. Der N1-Substituent scheint dagegen vorwiegend lipophile Interaktionen (Chidangil et al., 2004) einzugehen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Parallelen zwischen der Molekülstruktur, den stereo- sowie physikochemischen Eigenschaften und den potentiellen Wirkungen der Fluorchinolon-Derivate gegenüber dem Glucose-Metabolismus ziehen:

- 1) Die einfache oder zweifache Methylierung des C7-Piperazyl-Substituenten in axialer bzw. equatorialer Position korreliert mit einer deutlich höheren räumlichen Ausdehnung. Die sterisch anspruchsvollen Struktur motive orientieren sich dabei vertikal zu der Längsachse des Moleküls.
- 2) Die gegenüber dem Glucose-Metabolismus ineffektiven bis gering wirksamen Fluorchinolone, *i.e.* Norfloxacin und die fluorphenylierten Strukturisomere C3 und C4, sind durch einen unmethylierten Piperazyl-Substituenten gekennzeichnet, der sich innerhalb der Moleküllängsachse orientiert. In der Konsequenz resultiert eine

geringe sterische Ausdehnung. Vergleichbare sterische Verhältnisse liegen ebenfalls bei dem Fluorchinolon Moxifloxacin vor, das in der C7-Position ein unmethyliertes und vollständig hydriertes 6*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-Motiv aufweist.

- 3) Die Stabilisierung der Molekülkonformation erfordert bei den ineffizienten Fluorchinolonen eine geringfügige Rotation des Piperazin-Ringes um die C7-N1'-Bindungsachse (50° bis 100°), wohingegen die energetisch begünstigten Konformere der betazytotropen Fluorchinolone bei wesentlich höheren Torsionswinkeln in einer Größenordnung von 200° bzw. 320° lokalisiert sind. Eine Sonderstellung nimmt das Fluorchinolon Moxifloxacin insofern ein, als dass sowohl in dem Bereich geringgradiger Rotation (100°) als auch erhöhter Rotation (310°) gleichwertige Energieminima vorliegen.
- 4) Der N1-Fluorphenyl-Substituent orientiert sich ungeachtet der ortho- oder para-Stellung des Fluoratoms an dem Phenyl-Ring orthogonal zu der Ebene des 4-Chinolon-Grundgerüsts - in einer Publikation wurde der Torsionswinkel bei ungefähr 90° determiniert (Mitscher, 2005). In Bezug auf die C7-Position scheint dieses Strukturmotiv keinen Einfluss auf die Molekülgeometrie auszuüben. Hinsichtlich des elektrostatischen Potentials ergeben sich jedoch deutliche Differenzen: in der Umgebung der Fluoratome werden Bereiche erhöhter elektrostatischer Anziehung konstituiert, so dass divergente Elektronendichteverteilungen und damit einhergehend unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungen resultieren.
- 5) Die Methoxylierung der C8-Position scheint für die betazytrophe Potenz der Fluorchinolone keine essentielle Bedeutung zu besitzen, da sich die methoxylierten Strukturanaloga Gatifloxacin und Moxifloxacin hinsichtlich der Stimulation der B-Zellen und der Insulinsekretion in ihrer Wirkung wesentlich voneinander differenzieren. In Kombination mit einem sterisch anspruchsvollen C7-Substituenten führt jedoch die Modifizierung der C8-Position zu einer Beeinflussung sowohl der räumlichen Ausdehnung des Moleküls als auch der Rotation der beiden Molekülebenen um die C7-N1'-Bindungsachse.

5. Diskussion

Beeinträchtigungen der Glucose-Homöostase durch Störungen der Insulinsekretion bzw. des Energie-Metabolismus sind als unerwünschte Reaktion der Fluorchinolone akzeptiert, die mit divergenter Inzidenz die gesamte Klasse der Fluorchinolone betrifft (Khovidhunkit und Sunthornyothin, 2004). Zahlreiche Vertreter der dritten und vierten Generation, unter anderem die Fluorchinolone Terafloxacin (Ball und Tillotson, 1995; von Keutz und Christ, 1998), Clinafloxacin (Rubinstein, 2001; Shailer et al., 1997), Levofloxacin (Friedrich und Dougherty, 2004; Graumlich et al., 2007; Wang und Rizvi, 2006), Lomefloxacin (Suda et al., 2000) und Gatifloxacin (Guay, 2005; Happe et al., 2004), sind mit einem erhöhten Risiko für Hypoglykämien als auch Hyperglykämien verbunden.

Die ursprüngliche Annahme, dass Typ II-Diabetiker aufgrund von Interaktionen zwischen oralen Antidiabetika und den Fluorchinolonen, unter anderem Ciprofloxacin (Roberge et al., 2000; Lin et al., 2004) sowie Gatifloxacin (Gajjar et al., 2000a; Menzies et al., 2002; LeBlanc et al., 2004), gefährdet sind, wurde durch das Auftreten dysglykämischer Störungen bei Patienten ohne Prädispositionen widerlegt (Arce et al., 2004; Frothingham, 2005; Happe et al., 2004; Khovidhunkit und Sunthornyothin, 2004). Demgemäß scheinen in Analogie zu den cardiotoxischen und phototoxischen Eigenschaften sowie den ZNS-toxischen Reaktionen strukturelle sowie physikochemische Eigenschaften der Fluorchinolone für die Interferenz mit der Glucose-Homöostase ursächlich zu sein.

Um das dysglykämische Potential ausgewählter Fluorchinolone unter *in vitro*-Bedingungen zu reproduzieren und die betazytotropen Effekte weiterer Derivate gegenüber den Insulin-synthetisierenden B-Zellen zu beurteilen, wurden in dieser Arbeit die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und das Membranpotential endokriner B-Zellen aus Primärkulturen untersucht. Die Abhängigkeit des grundlegenden Mechanismus von dem ATP-sensitiven K^{+} -Kanal wurde durch zusätzliche Untersuchungen an SUR1-*knock out*-Mäusen analysiert, deren pankreatische B-Zellen keine funktionellen K_{ATP} -Kanäle exprimieren.

Assoziationen zwischen dem Risiko für hypoglykämische Ereignisse und den strukturellen Komponenten bzw. stereochemischen Eigenschaften der einzelnen Fluorchinolon-Derivate wurden durch die semiempirische Berechnung der Molekülgeometrie, Analysen der Konformation und Determinierung des elektrostatischen Potentials untersucht.

5.1 Bedingungen und Problematiken der ratiometrischen Fluoreszenzmessungen

5.1.1 Verwendbarkeit der pankreatischen B-Zelle für die Charakterisierung der Fluorchinolon-induzierten Effekte gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

Um das insulinotrope bzw. betazytotrope Potential ausgewählter Fluorchinolone auf der Grundlage der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu analysieren, sind grundsätzlich zwei Modelle einsetzbar. In erster Linie stellen isolierte Langerhans-Inseln geeignete Messobjekte dar, die Untersuchungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration während einer Exposition mit variablen Testsubstanzen unter weitgehend physiologischen Bedingungen ermöglichen. Zum anderen gestattet die Perfusion der dissoziierten B-Zellen, intrazelluläre Ca^{2+} -Signale mit einer hohen temporalen und spatialen Auflösung ratiometrisch zu charakterisieren. Bei der Auswahl eines geeigneten Messobjektes waren die im Folgenden angeführten Vor- und Nachteile gegeneinander abzuwägen, wobei sich im Hinblick auf die Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit experimentelle Untersuchungen an den isolierten und primär kultivierten B-Zellen als geeigneter erwiesen (s. Kap. 4.2.3.2).

1) Ratiometrische Fluoreszenzmessungen unter Verwendung von Einzelzellen bieten im Vergleich zu den Langerhans-Inseln den Vorteil, dass schnelle Ca^{2+} -Signale innerhalb des Zytoplasmas mit einer höheren temporalen Auflösung registriert werden können. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Substanz-abhängige Diffusion bzw. Penetration der Fluorchinolone sowie des Indikators Fura-2 mit einer höheren Dynamik. Demgegenüber werden die Testsubstanzen auf der Ebene der Langerhans-Insel innerhalb der komplexen Strukturen über einen längeren Zeitraum arretiert. Zudem wirken sich anhaftende Fragmente des exokrinen Pankreasgewebes nachteilig auf die Kinetik der induzierten Wirkungen gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration aus. Implizit werden prompte Effekte aufgrund der zeitlichen Verzögerung bei den ratiometrischen Registrierungen mit einer geringeren Intensität und Auflösung dargestellt als bei den Einzelzellen. Dieser Sachverhalt könnte ursächlich sein für die im Vergleich zu den isolierten B-Zellen (s. Abb. 4.2.4.1 bzw. Abb. 4.2.5.2) geringere Effizienz der Fluorchinolone C2 und Lomefloxacin auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter Langerhans-Inseln (s. Abb. 4.2.3.2). Bei diesem Messobjekt war die sowohl durch das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 als auch durch Lomefloxacin induzierte Steigerung der Fura-Fluoreszenz-Ratio durch ein geringeres Ausmaß und einen verzögerten Wirkungseintritt gekennzeichnet.

2) Ein weiteres Kriterium, das die Verwendung von Langerhans-Inseln als Versuchsobjekte für die in dieser Arbeit verwendeten Versuchsprotokolle ausschloss, begründet sich durch die nicht mögliche Differenzierbarkeit zwischen den einzelnen B-Zellen. Als Konsequenz werden bei der Definition der *regions of interest* (ROIs) (s. Kap. 3.5.5) auf der Oberfläche einer fokussierten Langerhans-Insel mehrere Zellen gleichzeitig erfasst, die unter ungünstigen Bedingungen verschiedenen Populationen angehören. Für die erfolgreiche Dissoziation zwischen der Autofluoreszenz der Fluorchinolone und der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 stellt die Analyse einer adäquaten Anzahl an Einzelzellen eine wichtige Voraussetzung dar, die auf der Ebene von Langerhans-Inseln aus den genannten Gründen nicht realisierbar ist.

3) Die ratiometrischen Fluoreszenzmessungen wurden vorwiegend an den isolierten B-Zellen des Pankreas durchgeführt, um eine direkte Beziehung zwischen dem depolarisierenden Potential der analysierten Fluorchinolone und den Effekten gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration herstellen zu können.

4) Nachteilig zu bewerten ist, dass die dynamischen Perfusionen der pankreatischen B-Zellen im Vergleich zu den Langerhans-Inseln einer zeitlichen Limitierung unterliegen. Als Konsequenz ist die Darstellung und Analyse der Reaktionskinetik in einem längerfristigen Zeitintervall nicht realisierbar. Daher ist es sinnvoll, die insulinotropen Eigenschaften der Fluorchinolone unter Verwendung von isolierten Langerhans-Inseln zu analysieren, die über einen wesentlich längeren Zeitraum perfundiert werden können. Unter diesen Bedingungen sind langfristige Effekte der untersuchten Fluorchinolone auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration und die Insulinsekretion verifizierbar.

5.1.2 Identitätsprüfung der isolierten B-Zellen des Pankreas durch die Glucose-induzierte Stimulation und Ansprechbarkeit gegenüber einem externen K^+ -Stimulus

Aufgrund der morphologischen Organisation der Langerhans-Inseln aus vier verschiedenen Zellpopulationen (Hellman, 1967; Orci, 1976; Pipeleers et al., 1987) war es erforderlich, bei der Durchführung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie und den *patch clamp*-Messungen auf morphologischer und funktioneller Ebene einige wichtige Kriterien zu beachten. Hinsichtlich der ratiometrischen Fluoreszenzmessungen betraf dies vor allem die Auswahl der *regions of interest*, die für die Berechnung der Kinetiken auf der Oberfläche der Langerhans-Inseln bzw. der dissoziierten Einzelzellen definiert wurden. Bezüglich der bekannten mikroskopischen Erscheinung der endokrinen B-Zellen (Berts et al.,

1995; Dean, 1973; Hellman, 1967) wurden bevorzugt ovale Zellen größeren Durchmessers (12 bis 15 μm) fokussiert, deren Zytoplasma durch die Präsenz zahlreicher Sekretgranula (Barg et al., 2001) auf den peripheren Bereich limitiert war. Bemessen an dem ausgeprägten Granulationsgrad - in dem Zytoplasma einer B-Zelle sind bis zu 13000 Granula lokalisiert (Dean, 1973) -, determinierte Pipeleers die Konzentration des vesikulär gespeicherten Insulins adulter B-Zellen auf einem Gehalt von 50 pg pro Zelle (Pipeleers, 1987).

Im Gegensatz dazu wurden Einzelzellen geringerer Größenordnung von den Messungen ausgeschlossen, da Zelldurchmesser in einem Bereich von ungefähr 10 μm bis 12 μm für die Somatostatin-synthetisierenden D-Zellen kennzeichnend sind (Barg et al., 2000). Unter den Bedingungen der Zellisolation und Kultivierung (s. Kap. 3.3) limitierte sich deren Anteil an der gesamten Zellmasse auf 2 % bis 5 % (Barg et al., 2000).

Als weitere Population waren die A-Zellen zu berücksichtigen, die sich ebenfalls durch einen geringen Durchmesser und eine wesentlich geringer ausgeprägte Sensitivität sowohl gegenüber Glucose als auch Tolbutamid von den B-Zellen differenzieren (Gregorio et al., 1992; Johansson et al., 1989; Nadal et al., 1999). Zurückgeführt wird die Resistenz gegenüber diesen insulintropen Substanzen auf die geringe Dichte an K_{ATP} -Kanälen, die in der Plasmamembran identifiziert werden konnte (Barg et al., 2000, Quesada et al., 1999).

Basierend auf diesen Überlegungen wurde die Charakterisierung der isolierten B-Zellen des Pankreas initial vor der eigentlichen Expositionsphase mit dem jeweiligen Fluorchinolon durch die charakteristische Ansprechbarkeit gegenüber einem maximal depolarisierenden K^+ -Stimulus nachgewiesen (Rustenbeck, 1999). Parallel dazu wurden die elektrischen Eigenschaften der aus einem gemeinsamen Präparat isolierten und kultivierten B-Zellen im Rahmen von *patch clamp*-Messungen in der *whole cell*-Konfiguration analysiert. Wie bereits an anderer Stelle erwähnt (Berts et al., 1995; Pralong et al., 1990), werden unter den herrschenden Bedingungen der Zellisolation und Primärkultivierung (s. Kap. 3.3) ungefähr 75 % der Einzelzellen durch B-Zelle repräsentiert. Dementsprechend wiesen die Zellen mittleren Durchmessers ($\sim 15 \mu\text{m}$) in der Regel die für pankreatische B-Zellen charakteristischen elektrischen Eigenschaften auf.

Durch diese Vorgehensweise war es möglich, die aufgrund der begrenzten Zellvitalität nicht realisierbare funktionelle und biochemische Charakterisierung der isolierten Einzelzellen hinreichend zu ersetzen. Ebenso konnte in zahlreichen ratiometrischen Fura-Fluoreszenzmessungen gezeigt werden, dass die ermittelten Versuchsdaten vorwiegend die Reaktionen pankreatischer B-Zellen (Gilon und Henquin, 1992; Grapengiesser et al., 1988) auf die Exposition mit variablen Testsubstanzen repräsentieren.

Die von einigen Autoren beschriebene Heterogenität gereinigter B-Zellen hinsichtlich der Glucose-Sensitivität (Kiekens et al., 1989; Schuit et al., 1988) sowie die Variabilität der individuellen Schwellenpotentiale der Glucose-induzierten elektrischen Aktivität (Dean und Matthews, 1970) wurden in vereinzelt Fällen beobachtet. In der Regel waren die isolierten B-Zellen durch vergleichbare funktionelle Eigenschaften gekennzeichnet, die - wie bereits angeführt - durch das Isolationsverfahren und die Kultivierungsbedingungen beeinflusst wurden.

5.1.3 Abhängigkeit der endogenen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone von den Umgebungsparametern

Das Ausmaß und die Qualität der Interferenz zwischen der intrinsischen Fluoreszenz der Fluorchinolone und den Fluoreszenzsignalen des Ca^{2+} -sensitiven Indikators Fura-2 wird durch zahlreiche Faktoren determiniert, die vorwiegend auf das physikochemische Verhalten der Fluorchinolone als auch die physiologischen Eigenschaften der endokrinen B-Zellen zurückzuführen sind. Im Vordergrund steht dabei die variable Ca^{2+} -Konzentration, die in dem Zytoplasma der Zellen herrscht und infolge eines effektiven Stimulus massive Steigerungen erfährt. Daneben spielt im Hinblick auf das Fluorchinolon-spezifische Ausmaß der Proteinbindung, vorwiegend an dem Protein Albumin bzw. dem Ca^{2+} -bindenden Parvalbumin des Zytoplasmas (Pietrobon et al., 1990), die Proteinkonzentration in dem intrazellulären Milieu eine wichtige Rolle. Von den geprüften Fluorchinolonen, die generell eine geringe Proteinbindungsrate unterhalb von 50 % aufweisen (Stahlmann und Lode, 1998), sind Ciprofloxacin (30 %) und Moxifloxacin (47 %) im Vergleich zu Gatifloxacin (20 %) und Lomefloxacin (10 % bis 21%, Okezaki et al., 1989) durch eine erhöhte Proteinbindung gekennzeichnet (Zhanel und Noreddin, 2001).

Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen, die in dem extrazellulären Milieu und in dem Zytoplasma der isolierten B-Zellen herrschen, sind Interaktionen mit den Phospholipiden (Fresta et al., 2002; Montero et al., 1994), Proteinen oder anderen zellulären Komponenten ebenfalls in Betracht zu ziehen. Wechselwirkungen zwischen den Fluorchinolonen und den Phospholipiden biologischer Membranen sowie kovalente Bindungen an Proteinen sind in einigen *in vitro*-Studien durch die mit diesen Prozessen einhergehenden quenchenden Wirkungen nachgewiesen worden (Fresta et al., 2002; Montero et al., 1994; Neves et al., 2007). In Bezug auf die variable Penetrationsfähigkeit der Fluorchinolone, die bei den Vertretern der jüngeren Generation Moxifloxacin (Neves et al., 2007) und Gatifloxacin infolge der hydrophoben Eigenschaften hohe Raten erzielt, ist ferner

das Zellvolumen sowie die Anzahl der isolierten B-Zellen zu berücksichtigen, in denen die Testsubstanzen akkumulieren können. Insbesondere Moxifloxacin scheint aufgrund der im Vergleich zu den Vertretern der ersten Generationen erhöhten lipophilen Eigenschaften sowie des veränderten elektrostatischen Potentials (Neves et al., 2007) für komplexe Interaktionen mit den Phospholipiden der Plasmamembran prädestiniert zu sein.

Die Modulation der Fluoreszenzeigenschaften durch den pH-Wert und die Polarität des Mediums wurden ebenfalls eingehend charakterisiert und bestätigen die im Rahmen der spektrofluorimetrischen Analyse beobachteten bathochromen Verschiebungen der Emissionsmaxima mit zunehmender Polarität des Mediums (Montero et al., 1994; Ross und Riley, 1992). Der Einfluss der Protonen-Konzentration auf die endogenen Fluoreszenzeigenschaften ist insofern zu berücksichtigen, da innerhalb der Sekretgranula ein geringerer pH-Wert (5,5; Dodson und Steiner; 1998) herrscht als in dem Zyotosol.

Die Resultate der spektrofluorimetrisch charakterisierten Fluoreszenzeigenschaften der Testsubstanzen sind mit den in der Literatur veröffentlichten Daten konform, die im Allgemeinen zwei Exzitationsmaxima in einem Bereich von 272 nm bis 284 nm und 310 nm bis 340 nm (Montero et al., 1994) sowie Emissionsmaxima in einem Bereich von 440 nm bis 460 nm angeben. Geringfügige Abweichungen von den Literaturdaten sind auf die unterschiedlichen Konzentrationsbereiche, auf die sich die Versuchsdaten beziehen, sowie die divergenten Medien, pH-Werte und Messbedingungen zurückzuführen. Rieutord et al. (1994) determinierten das Fluoreszenzmaximum des Fluorchinolons Ciprofloxacin in Aqua bidest. bei einer Wellenlänge von 440 nm, während Montero maximale Emissionen bei einer Wellenlänge von 448 nm registrierte (Montero et al., 1994). In einem HEPES-gepufferten Medium wurde für die endogene Fluoreszenzemission des Fluorchinolons Moxifloxacin ein Maximum bei einer Wellenlänge von 460 nm ermittelt (Neves et al., 2007). In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Exzitationseigenschaften von der Konzentration der Fluorchinolone abhängig sind. Oberhalb eines Gehaltes von 80 μM werden jedoch infolge von vermuteten intermolekularen Aggregationen keine weiteren bathochromen Verschiebungen der Exzitationsmaxima verursacht (Montero et al., 1994; Ross und Riley, 1994). Dieser Sachverhalt erklärt die vorwiegend in dem längerwelligen Spektralbereich (310 nm bis 350 nm) registrierten Exzitationsmaxima, die sich auf eine Fluorchinolone-Konzentration von 100 μM beziehen. Demgegenüber wurden die in den zitierten Studien charakterisierten Fluoreszenzdaten unter Verwendung von Analysen determiniert, deren Konzentrationen sich auf einem Bereich von 1 μM bis 10 μM begrenzen.

In Anbetracht dieser zahlreichen Einflussfaktoren und der komplexen Verhältnisse, die in dem Zytosol der Zellen herrschen, wird deutlich, dass die ratiometrischen Analysen exakte Messbedingungen unter weitgehend identischen Voraussetzungen erforderten. Dementsprechend war für die Durchführung eines Versuchszyklus eine adäquate Anzahl an B-Zellen vergleichbarer Größenordnung und mikroskopischer Erscheinung einzusetzen, die jeweils aus einem identischen Präparat isoliert wurden. Um physiologische Variationen zu berücksichtigen, wurden die in dieser Arbeit vorgestellten arithmetischen Mittelwerte \pm SEM der Nettofluoreszenz-Ratio aus den Resultaten von mindestens drei Versuchszyklen berechnet. Außerdem wurden Präparationen aus drei verschiedenen NMRI-Albinomäusen für die Bewertung der Fluorchinolon-induzierten Effekte herangezogen. Bedingt durch diese Vorgehensweise und die - insbesondere bei Gatifloxacin, Ciprofloxacin und den congenen Fluorchinolonen C1 bis C4 - sehr konstanten Fluoreszenzeigenschaften, die in Gegenwart variabler Medien spektrofluorimetrisch analysierten wurden (s. Kap. 4.1), sind von validen Ergebnissen der ratiometrischen Perifusionsmessungen auszugehen.

5.1.4 Interferenz zwischen der Fluoreszenzemission des Indikators Fura-2 und der endogenen Fluoreszenzaktivität der Fluorchinolone

Die in der Literatur verfügbaren Informationen über die qualitativen und quantitativen Fluoreszenzeigenschaften einiger therapeutisch relevanter Fluorchinolone, *i.e.* Ciprofloxacin, Norfloxacin, Lomefloxacin, Ofloxacin und Moxifloxacin, lassen Abhängigkeiten von der Präsenz bivalenter Kationen in dem umgebenden Milieu erkennen (Fresta et al., 2002; Montero et al., 1994; Riley et al., 1993; Song et al., 2005). Bezüglich der Affinität gegenüber bi- bzw. polyvalenten Kationen dominiert die Komplextendenz mit freien Mg^{2+} - und Al^{3+} -Kationen, während die Ca^{2+} -Affinität geringer ausgeprägt ist (Ross und Riley, 1992). Beruhend auf den Ergebnissen einiger Studien nimmt die Komplextendenz der Fluorchinolone mit bi- bzw. polyvalenter Kationen in der folgenden Reihenfolge $\text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Fe}^{3+} \ll \text{Al}^{3+}$ zu (Förster et al., 1998; Ross und Riley, 1992; Shimada et al., 1992). Die Koordination der Metallkationen an die 4-Keto-3-carboxyl-Sequenz (Ross und Riley, 1992; Mitscher, 2005) in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2 bzw. 1:3 (Ross und Riley, 1992; Song et al., 2005) führt zu einer hypo- oder hyperchromen Änderung der Fluoreszenzemission. Während Cu^{2+} -Ionen eine Quenchung der Fluoreszenzintensität verursachen (Song et al., 2005; Ross und Riley, 1992), korreliert die Chelatierung von Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Ionen mit einer Konzentrations-abhängigen Steigerung der Fluoreszenzintensität um 5 % bis 15 % (Förster et al., 1998; Shakibaei et al., 2002). In

Relation zu dem hyperchromen Effekt der Ca^{2+} -Ionen ist die Intensitätssteigerung durch eine adäquate Mg^{2+} -Konzentration deutlich stärker ausgeprägt. Die Interaktion mit Na^{+} - und K^{+} -Ionen zeigt demgegenüber keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität (Fresta et al., 2002; Song et al., 2005). Im Gegensatz dazu werden die qualitativen Fluoreszenzeigenschaften durch die Interaktionen mit freien Mg^{2+} -, Ca^{2+} - und Al^{3+} -Ionen (Ross und Riley, 1992) sowie Cu^{2+} -Ionen (Song et al., 2005) nicht beeinflusst.

Die spektrofluorimetrische Charakterisierung der Ca^{2+} -modulierenden Wirkung auf die Intensität der Fluorchinolon-induzierten Fluoreszenzemission ist aufgrund der komplexen Krebs-Ringer-Medien mit den Literaturdaten nicht direkt vergleichbar. In der Regel korrelierte die Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen mit einem geringfügigen hypochromen Effekt, der bei den methoxylierten Analoga Gatifloxacin und Moxifloxacin nicht in Erscheinung trat. Bei diesen Substanzen wurde in Gegenwart freier Ca^{2+} -Ionen eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität registriert. Im Hinblick auf die Ca^{2+} -Abhängigkeit der qualitativen Fluoreszenzeigenschaften reflektieren die Versuchsergebnisse einheitlich eine in der Regel geringfügige hypsochrome Verschiebung der Exzitationsmaxima um 5 nm bis 10 nm. Als Konsequenz wurden die Maxima der Strahlungsabsorption in den für die ratiometrische Fluoreszenzmessung relevanten Spektralbereich von 340 nm bis 345 nm (fluorphenylierte Fluorchinolone C1 bis C4, Lomefloxacin, Ciprofloxacin) bzw. 350 nm bis 355 nm (Norfloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin) verschoben. Demgegenüber wurden die Emissionsmaxima durch die Präsenz freier Ca^{2+} -Ionen nicht wesentlich beeinflusst, sondern zeichneten sich - insbesondere bei den fluorphenylierten Fluorchinolonen C1 bis C4 sowie Ciprofloxacin und Gatifloxacin - durch konstante Werte aus.

Eine Konkurrenz zwischen den Fluorchinolonen und dem Indikator Fura-2 um freie Ca^{2+} -Ionen sowie eine puffernde Wirkung der Testsubstanzen gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ist, aufgrund der im Vergleich zu Mg^{2+} -Ionen geringen Ca^{2+} -Affinität, nicht zu erwarten (Förster et al., 1998; Ross und Riley, 1992). Dieser Sachverhalt wird durch die Bindungskonstanten als Ausdruck für die Ionenselektivität verdeutlicht: Ross und Riley analysierten für Komplexe aus Lomefloxacin und Mg^{2+} - bzw. Al^{3+} -Ionen eine wesentlich höhere Stabilität als für die entsprechenden Ca^{2+} -Komplexe (Ross und Riley, 1992). Konforme Ergebnisse wurden von Shimada et al. (1992) veröffentlicht, die für die Fluorchinolone Lomefloxacin, Ofloxacin und Levofloxacin eine bevorzugte Bildung stabiler Al^{3+} -Komplexe als vergleichsweise mit anderen polyvalenten Ionen ermittelten. In Relation dazu dokumentieren die Dissoziationskonstanten der Fura-2-abgeleiteten Ca^{2+} - bzw. Mg^{2+} -Komplexe mit Werten von $K_D = 145 \text{ nM}$ bzw. $K_D = 2,8 \text{ nM}$ (Takahashi et al., 1999) eine

vergleichsweise höhere Sensitivität, die für die Realisierung der ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen eine wichtige Voraussetzung darstellt.

In Bezug auf die Interferenz zwischen der Fura-Fluoreszenz-Ratio und der endogenen Fluoreszenzemission der Fluorchinolone ist der Mg^{2+} -Konzentration, die innerhalb der endokrinen B-Zelle unter physiologischen Bedingungen 0,7 mM beträgt (Alvarez-Leefmans et al., 1987; Murphy, 1993), aufgrund der hyperchromen Wirkung auf die Fluoreszenzintensität größere Beachtung beizumessen als der Ca^{2+} -Konzentration. In einer Studie konnte für Ofloxacin eine relevante Interaktion mit Mg^{2+} -Ionen in einer Konzentration von 4,2 mg/L, die den intrazellulären Verhältnissen entspricht, nachgewiesen werden. Oberhalb eines Mg^{2+} -Gehaltes von 348 mg/L, der mit den extrazellulären Verhältnissen korrespondiert, findet jedoch keine weitere Steigerung der Fluoreszenzintensität statt (Fresta et al., 2002).

Zusammenfassend verdeutlicht sich, dass weder die Erhöhung bzw. D600-vermittelte Reduktion der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration noch Variationen der Mg^{2+} -Konzentration während der Exposition mit den Fluorchinolonen eine Änderung der intrinsischen Fluoreszenzintensität verursachen. Dieses konstante Verhalten wird durch die ratiometrisch charakterisierte Autofluoreszenz belegt, die sich bei den analysierten Testsubstanzen durch sehr konstante Intensitäten auszeichnet (s. Abb. 4.3.3.2). Im Hinblick auf das Ausmaß der ermittelten Fluoreszenz-Ratio ist aufgrund der Exzitationseigenschaften der Fluorchinolone, die ähnlich wie der Indikator Fura-2 in dem höherfrequenten Spektralbereich von 310 nm bis 350 nm maximale Strahlungsabsorptionen aufweisen, von einer zusätzlichen Steigerung auszugehen. Dieser Effekt wird jedoch teilweise oder vollständig durch die gleichzeitige Intensitätserhöhung der bei 380 nm induzierten Fluoreszenzemission kompensiert (s. Abb. 4.3.3.2).

5.1.5 Beeinträchtigung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio durch intrinsische Fluoreszenzsignale der Fluorchinolone

Kritisch zu betrachten sind die während der Exposition mit den methoxylierten Fluorchinolonen Gatifloxacin und Moxifloxacin registrierten und berechneten Nettobeträge der Fura-Fluoreszenz-Ratio. Als Hinweis auf mögliche artifizielle Einflüsse ist die gegenüber dem Antagonisten D600 resistente Nettofluoreszenz-Ratio (Abb. 5.1.5) anzusehen, die mit einer ungewöhnlich prompten Kinetik (Minute 61) aussetzt. Die vollständige Suppression auf das prästimulatorische Niveau korreliert unmittelbar mit der Beendigung der Exposition mit der jeweiligen Testsubstanz und scheint daher in einem direkten Zusammenhang mit der intrinsischen Fluoreszenz der Fluorchinolone zu stehen.

Da die Struktur-Analoga Gatifloxacin und Moxifloxacin im Vergleich zu den unmethoxylierten Fluorchinolonen eine besonders langwellige Fluoreszenzstrahlung in dem blau-violetten Spektralbereich emittieren (460 nm bis 470 nm), die implizit den Langpaß-Filter (430 nm) ungehindert passiert, könnte die D600-resistente Signalkomponente auf endogene Fluoreszenzemissionen beruhen. Diese Vermutung scheint bei dem direkten Vergleich der in Gegenwart der Fluorchinolone analysierten Nettofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 5.1.5) begründet zu sein: Unter Berücksichtigung des geringfügig variierenden Basalniveaus um fünf Einheiten lässt sich sowohl ein gleichartiges Muster als auch eine vergleichbare Kinetik der Kurvenprofile von Minute 50 bis Minute 60 erkennen.

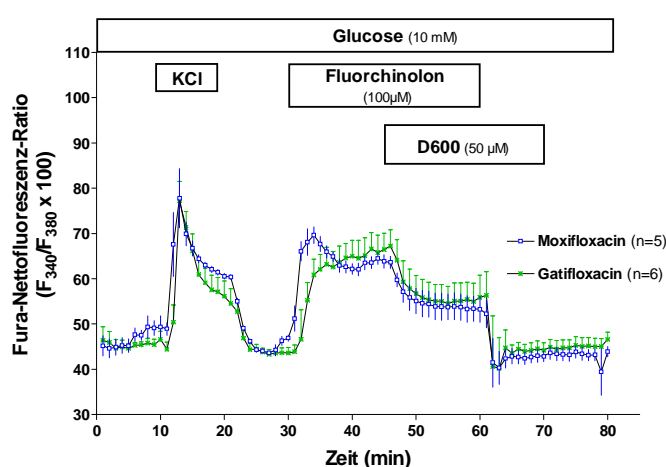


Abbildung 5.1.5 Vergleich zwischen der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio der methoxylierten Fluorchinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin Die primär kultivierten B-Zellen des Pankreas wurden von Minute 30 bis Minute 60 mit den Testsubstanzen perfundiert. Um die Beteiligung eines exogenen Ca^{2+} -Influx zu analysieren, befand sich der L-Typ- Ca^{2+} -Kanal-Antagonist D600 von Minute 45 bis Minute 70 in dem Medium. Der Vergleich zwischen der Kinetik und dem Signalmuster der registrierten Nettofluoreszenz-Ratio reflektiert funktionelle Differenzen zwischen den Struktur-Analoga. Auffallend ist jedoch, dass die D600-resistente Komponente bei beiden Fluorchinolonen durch eine vergleichbare Intensität und Dynamik gekennzeichnet ist.

Eine derart D600-resistente Signalkomponente wurde weder bei der Nettofluoreszenz-Ratio der fluorphenylierten Fluorchinolone C1 bis C4 noch bei den Registrierungen der therapeutisch relevanten Derivate Lomefloxacin, Norfloxacin und Ciprofloxacin beobachtet. Vielmehr waren die induzierten Effekte auf die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch eine hohe Ansprechbarkeit gegenüber dem D600-vermittelten Antagonismus charakterisiert, die sich in der Regel durch die Reduktion der Fura-Ratio unterhalb des prästimulatorischen Niveaus manifestierte. Aus diesem Grund ist bei diesen Testsubstanzen davon auszugehen, dass die induzierte Steigerung der Fura-Nettofluoreszenz-

Ratio Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsignale repräsentiert. Erhärtet wird diese Schlussfolgerung durch die in der Regel unveränderte Kinetik und Intensität der D600-sensitiven Signalkomponente, die vor und nach der Bildung der Nettofluoreszenz-Ratio registriert wurde (s. Abb. 4.2.4.5 (A) und (B)).

Gemäß den angeführten Argumenten ist die Vermutung nahe liegend, dass die Methoxyl-Gruppe in der C8-Position für die bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima in den blau-violetten Spektralbereich ursächlich ist. Interferenzen zwischen der endogenen Fluoreszenz der Fluorchinolone und der von dem Indikator Fura-2 emittierten Fluoreszenzstrahlung können bei den anderen Testsubstanzen insofern ausgeschlossen werden, als dass die maximal Emission (410 nm bis 425 nm) vollständig von dem Langpass-Filter (430 nm) erfasst und aus dem Strahlengang reflektiert wurde.

5.2 Wirkungen ausgewählter Fluorchinolone gegenüber den pankreatischen B-Zellen der NMRI-Albinomaus

5.2.1 Korrelationen zwischen dem Ca^{2+} -steigernden Effekt und dem depolarisierenden Potential ausgewählter Fluorchinolone

Eine eindeutige Datenlage herrscht bei den therapeutisch relevanten Struktur-Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin sowie dem methoxylierten Derivat Gatifloxacin. Für die fluorphenylierten Strukturisomere C1 und C2 sowie das congenere Fluorchinolon C3 lassen sich auf biologischer bzw. elektrophysiologischer Ebene ebenfalls konforme Wirkungsweisen beschreiben. Im Gegensatz dazu sind die induzierten Effekte des Fluorchinolons C4, aufgrund der relativ hohen Standardabweichung der Nettofluoreszenz-Ratio (s. Abb. 4.2.5.4) sowie der geringen Depolarisationsrate (s. Tab. 4.4.2), nicht sicher zu beurteilen. Diskrepanzen zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stimulatorischen Wirkung und der depolarisierenden Effizienz herrschen lediglich bei dem p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 und Moxifloxacin.

a) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernde Effizienz der Fluorchinolone: Die Fluorchinolone Gatifloxacin, Lomefloxacin und das o-fluorphenylierte Derivat C2 sind durch stimulatorische Eigenschaften gekennzeichnet, die eine effektive Steigerung der zytosolische Ca^{2+} -Konzentration verursachen (s. Abb. 5.2.1). Demgegenüber induziert Norfloxacin von allen analysierten Testsubstanzen das geringste Ausmaß des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernden Effektes, das von den Wirkungen der Strukturisomeren C3 und C4 geringfügig übertroffen wird. Dementsprechend ist bei diesen Fluorchinolonen von einer mäßigen bis geringen

betazytotropen Eigenschaft auszugehen. Bemessen an der mit einer Fluorchinolone-Konzentration von 100 μM erzielbaren maximalen Steigerung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio verringert sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stimulatorische Potenz der Testsubstanzen graduell in der folgenden Reihenfolge:

Gatifloxacin > Lomefloxacin, Fluorchinolone C2 >
Moxifloxacin > Fluorchinolone C1, Ciprofloxacin >
Fluorchinolone C4 und C3 > Norfloxacin

b) Depolarisierende Effizienz der Fluorchinolone: Diejenigen Fluorchinolone, die eine effektive Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induzierten, waren ebenfalls durch ausgeprägte depolarisierende Wirkungen in Abwesenheit von Glucose gekennzeichnet (s. Abb. 5.2.1). Die in der Literatur beschriebenen Oszillationen des Membranpotentials (Henquin und Meissner, 1984; Kinard et al., 1999) konnten nicht beobachtet werden. Vielmehr bewirkten die Fluorchinolone eine kontinuierliche Depolarisation, die nicht von den charakteristischen Ca^{2+} -abhängigen Aktionspotentialen (Ca^{2+} -spikes) (Dunne et al., 1994; Satin und Cook, 1985) überlagert wurde. In Bezug auf das Ausmaß der mit einer Fluorchinolone-Konzentration von 50 μM evozierbaren Depolarisation, die als gemeinsames Kennzeichen der Fluorchinolone einen partiell bzw. vollständig irreversiblen Charakter aufwies, lässt sich die relative Wirkstärke durch die folgenden Reihenfolge darstellen:

Gatifloxacin > Fluorchinolone C2, Ciprofloxacin >
Lomefloxacin, Fluorchinolone C1 und C3 >
Fluorchinolone C4, Norfloxacin > Moxifloxacin

Der Vergleich zwischen den Effekten der Fluorchinolone gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der depolarisierenden Wirkung dokumentiert bei einigen Derivaten - ungeachtet der divergenten Konzentrationsbereiche – deutliche Parallelen, die in der Gesamtheit eine stimulatorische Wirkung gegenüber den pankreatischen B-Zellen belegen. Es handelt sich im Einzelnen um die methylierten Fluorchinolone Gatifloxacin, Lomefloxacin sowie das Fluorchinolone C2 (s. Abb. 5.2.1). Das ebenfalls methylierte Strukturisomer C1 ist in Relation zu C2 durch eine moderate $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernde Wirkung gekennzeichnet, die sich von den Effekten der gering wirksamen Fluorchinolone C3 und C4 sowie Norfloxacin deutlich abhebt und in einem mit Ciprofloxacin vergleichbaren Ausmaß die elektrische Aktivität der B-Zellen stimuliert.

Das Pendant zu Lomefloxacin, Norfloxacin, ist dagegen als ineffizienter Aktivator pankreatischer B-Zellen anzusehen, der lediglich eine marginale Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie eine geringfügige Verringerung der Potentialdifferenz hervorruft, die das Schwellenpotentials von -50 mV (Henquin und Meissner, 1984) nicht unterschreitet. Eine vergleichbare ineffiziente Wirkung ist für das Fluorchinolon C4 anzunehmen, dessen Wirkung gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dem Membranpotential der isolierten B-Zellen durch eine geringe bis fehlende Effektivität gekennzeichnet ist.

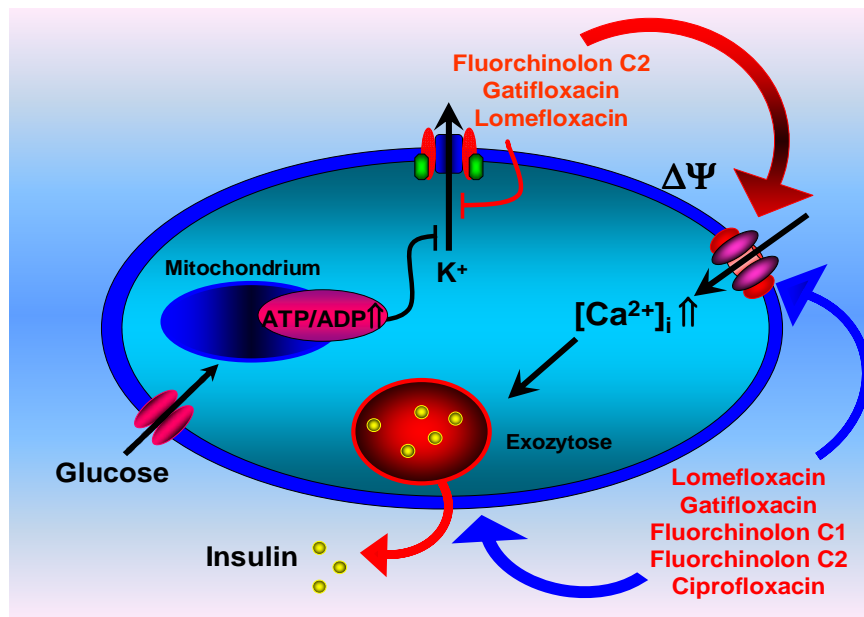


Abbildung 5.2.1 Glucose-selektive Fluorchinolone mit betazytotropen und insulinotropen Eigenschaften Die dargestellten Fluorchinolone induzieren einheitlich sowohl eine Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch eine effektive Depolarisation der isolierten B-Zellen. Die Substanzen führen jedoch in einem divergenten Ausmaß zu einer Steigerung der Insulinsekretionsrate, die in Präsenz eines moderaten Glucose-Stimulus von 10 mM eine deutlich höhere Effizienz erzielt als unter basalen Bedingungen (Pflöger, Diplomarbeit 2006; Şahin, Diplomarbeit 2007). Diese Glucose-Selektivität ist insbesondere für das Fluorchinolon Ciprofloxacin kennzeichnend.

Das methoxylierte Fluorchinolon Moxifloxacin ist im Hinblick auf die biologischen Effekte nicht eindeutig als Stimulator der pankreatischen B-Zelle zu identifizieren, da die insgesamt moderat ausgeprägte Steigerung der freien Ca^{2+} -Konzentration in einem Kontrast zu der ineffizienten Wirkung gegenüber dem Membranpotential steht. Nur bei dem Einsatz einer hohen Konzentration (100 μM) des Fluorchinolons ist das Ausmaß des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernden Effektes hinreichend, um eine mäßige Stimulation der elektrischen Aktivität der B-Zellen zu erreichen (s. *Abb. 4.4.1 (C)*). Zu vermuten sind daher artifizielle, auf die intrinsische Fluoreszenz zurückzuführende Einflüsse (s. Kap. 5.1.4) oder weitere Mechanismen, die auf biologischer Ebene zu einer Entkopplung zwischen der zytosolischen

Ca^{2+} -Konzentration und der elektrischen Aktivität der B-Zelle führen. Interessanterweise ist die Aktivität des unmethylierten Fluorchinolons C3 durch ein gegensätzliches Phänomen gekennzeichnet, das sich durch eine marginale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -stimulierende Wirkung, jedoch im Vergleich zu Moxifloxacin wesentlich effektiveren Depolarisation der B-Zelle äußert. Es ist daher anzunehmen, dass weitere Mechanismen direkt oder indirekt einen Beitrag an der betazytotropen Wirkung des Fluorchinolons C3 leisten, die jedoch in der Gesamtheit eine marginale Steigerung der Insulinsekretionsrate induziert (Pflöger, Diplomarbeit 2006).

5.2.2 Korrelationen zwischen den betazytotropen Effekten und der Wirkung der Fluorchinolone auf die Insulinsekretion

Eine eindeutige Korrelation zwischen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -aktivierenden Wirkung, dem depolarisierenden Potential sowie dem Ausmaß der Insulinsekretions-Steigerung existiert für die Fluorchinolone Gatifloxacin, Lomefloxacin und dem strukturellen Pendant Norfloxacin sowie den fluorphenylierten Fluorchinolonen C1 und C2. Diese Substanzen sind gemäß der Konsensustheorie gegenüber den grundlegenden Ereignissen der Insulinsekretions-Kopplung durch konforme Wirkungen charakterisiert. Unter Berücksichtigung der im Rahmen von Insulinsekretions-Messungen analysierten Daten (Pflöger, Diplomarbeit 2006; Şahin, Diplomarbeit 2007), sind die betazytotropen Eigenschaften der Testsubstanzen Gatifloxacin und Lomefloxacin sowie des Fluorchinolons C2 effektiv, um eine Steigerung der Insulinsekretionsrate um den Faktor 2 bis 6 zu induzieren. Eine geringere Wirkstärke ist für das Fluorchinolon C1 nachweisbar, das entsprechend der moderaten betazytotropen Wirkung lediglich eine mäßige Steigerung der Insulinsekretion hervorruft. Demgegenüber sind die unmethylierten Fluorchinolone Norfloxacin und C4 - wie in Bezug auf die experimentellen Daten erwartet werden sollte - nicht in der Lage, das Ausmaß der Insulinsekretion in Gegenwart eines moderaten Glucose-Stimulus von 10 mM zu amplifizieren.

Die Fluorchinolone Moxifloxacin und Ciprofloxacin sind im Vergleich zu den genannten Testsubstanzen durch divergente Effekte gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, dem Membranpotential und der Insulinsekretion gekennzeichnet, die zunächst nicht eindeutig auf insulinotrope bzw. betazytotrope Eigenschaften schließen lassen. Moxifloxacin induziert eine transiente Steigerung der zytosolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Steigerung, die durch eine schnelle erste Phase und eine zweite Phase geringerer Intensität charakterisiert ist. Im Gegensatz dazu führte die Exposition der pankreatischen B-Zellen nicht zu einer adäquaten Depolarisation. Diese Diskrepanz könnte für die Abhängigkeit des Effektes von einem gesteigerten Glucose-Metabolismus sprechen, die sich im Rahmen von

Untersuchungen der Insulinsekretions-steigernden Potenz des Fluorchinolons bestätigt hat (Şahin, Diplomarbeit 2007). Eine vergleichbare Situation ergibt sich für das Derivat Ciprofloxacin, von dem aufgrund der experimentellen Befunde eine betazytotrope Wirkung anzunehmen ist. Die induzierte Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und die ausgeprägte depolarisierende Wirkung scheinen jedoch unter substimulatorischen Bedingungen nicht hinreichend zu sein, um die Insulinsekretion zu initiieren. Diese Situation ändert sich jedoch grundlegend durch die dauerhafte Präsenz eines moderaten Glucose-Stimulus von 10 mM, der dem Fluorchinolon eine deutlich höhere insulinotrope Potenz verleiht (Şahin, Diplomarbeit 2007). Eine Erklärung für diese scheinbare Widersprüchlichkeit bietet die bekannte Abhängigkeit einer effektiven Exozytose der Sekretgranula von einer gesteigerten ATP-Synthese (Barg, 2003; Rustenbeck, 1997), die für die Rekrutierung und Aktivierung distaler Vesikel aus dem Speicherpool erforderlich ist (Barg et al., 2001; Bokvist et al., 1995).

Zusammenfassend dokumentieren die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen, dass eine effiziente Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei allen potent wirksamen Fluorchinolonen mit einer Amplifizierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion korreliert. Das Ausmaß und die Kinetik des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -aktivierenden Effektes gehen mit einer adäquaten Intensität und Dynamik der gesteigerten Insulinsekretionsrate einher. Dieser Zusammenhang äußert sich besonders deutlich bei den Fluorchinolonen C2, Gatifloxacin und Lomefloxacin, die innerhalb weniger Minute die Glucose-induzierte Insulinsekretion effektiv amplifizieren. Korrelationen lassen sich ebenfalls für die gering wirksamen Fluorchinolone feststellen: die gering ausgeprägte betazytotrope Eigenschaft des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C4 induziert lediglich eine geringgradige Steigerung der Insulinsekretion, wobei das maximale Ausmaß des Effektes nach einem Zeitraum von 30 Minuten nicht zu erreichen ist. Vergleichbare ineffiziente Wirkungen wurden für das p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 und Norfloxacin analysiert.

5.3 Wirkungen ausgewählter Fluorchinolone gegenüber den pankreatischen B-Zellen der SUR1-*knock out*-Maus

In dieser Arbeit wurde für die Dissoziation des K_{ATP} -Kanal-vermittelten Effektes von dem K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Mechanismus der Fluorchinolone das SUR1-*knock out*-Mausmodell verwendet. Entwickelt wurde dieses transgene Tiermodell in einer Arbeitsgruppe um Lydia Aguilar-Bryan und Joseph Bryan (Seghers et al., 2000). Die Inaktivierung der SUR1-Untereinheit basiert auf der Mutation des codierenden *ABCC8*-Gens, dessen Exon 2 durch eine

Pyromycinresistenz-Kassette ausgetauscht wurde. Aufgrund der regulativen Funktion der SUR1-Untereinheit für die korrekte Translokation und Insertion der Kanalproteine („*trafficking*“) in die Plasmamembran (Zerangue et al., 1999), wird die Konstitution funktionsfähiger (SUR1/K_{ir}6.2)₄-Kanäle verhindert. In diesem Zusammenhang besitzt die Co-Expression der funktionellen und regulatorischen Untereinheit eine zentrale Bedeutung, da die Translokation der Kanalproteine und die Rekonstitution des einwärtsgerichteten K_{ATP}-Kanals die Abschirmung eines auf der porenbildenden K_{ir}6.2-Untereinheit lokalisierten Retentionssignals durch das SUR1-Protein und umgekehrt erfordert (Inagaki et al., 1995; Zerangue et al., 1999).

Die physiologischen und funktionellen Eigenschaften sowohl isolierter SUR1-*k.o.*-Pankreasinseln als auch der dissoziierten B-Zellen wurden in einigen Arbeitsgruppen untersucht und charakterisiert (Seghers et al., 2000; Nenquin et al., 2004). Die Abwesenheit funktioneller K_{ATP}-Kanäle äußert sich auf der Ebene der isolierten B-Zelle durch eine partielle Depolarisation der Plasmamembran sowie kontinuierliche Ca²⁺-Aktionspotentiale und erhöhte [Ca²⁺]_i-Werte, die bereits unter substimulatorischen Bedingungen nachweisbar sind (Doliba et al., 2004; Nenquin et al., 2004; Shiota et al., 2002). Die veröffentlichten Daten über die funktionellen Eigenschaften und die Glucose-Selektivität der SUR1-*k.o.*-Inseln verdeutlichen überwiegend, dass die substimulatorische Insulinsekretion den basalen Verhältnissen entspricht, jedoch durch den weitgehenden Verlust der Glucose-Sensitivität lediglich marginal stimulierbar ist (Seghers et al., 2000; Shiota et al., 2002).

Das prästimulatorische Niveau der Ratio war in Relation zu den B-Zellen der NMRI-Albinomaus bei den SUR1-*k.o.*-B-Zellen geringer ausgeprägt und durch relativ konstante Werte gekennzeichnet. Diese Beobachtung deutet auf eine fehlende bzw. geringe Glucose-Ansprechbarkeit der mit 10 mM Glucose perfundierten B-Zellen hin, die ungeachtet der nicht exprimierten K_{ATP}-Kanäle alle wichtigen Kriterien funktionsfähiger bzw. elektrisch aktiver Zellen aufwiesen. Dementsprechend konnte die Depolarisierbarkeit der isolierten B-Zellen mit einer maximalen K⁺-Konzentration von 49,5 mM, die unabhängig von dem K_{ATP}-Kanal als effektiver Induktor wirkt (Rustenbeck, 1999), belegt werden. Das Ausmaß des Effektes unterlag jedoch einer Glucose-Abhängigkeit, so dass der Kontrollstimulus bei den SUR1-*k.o.*-B-Zellen eine geringere Intensität erreichte. Bezüglich des Sekretionsverhaltens der SUR1-*k.o.*-Inseln wurde unter *in vitro*-Bedingungen bestätigt, dass die Insulinsekretionsrate unter Basalbedingungen den Normwerten entspricht und gegenüber Glucose-Expositionen keine bis sehr geringe Steigerungen erfährt (Pflöger, Diplomarbeit 2006; Şahin, Diplomarbeit 2007).

Die Fluorchinolone C2, Gatifloxacin und Lomefloxacin, die als effiziente Inhibitoren des K_{ATP} -Kanals identifiziert wurden (Saraya et al., 2004; Züinkler und Wos, 2003; Züinkler et al., 2006), induzieren gegenüber den SUR1-*k.o.*-B-Zellen geringe Effekte, deren Mechanismus auf einem wirksamen D600-Antagonismus hindeutet. In Relation zu den pankreatischen B-Zellen der NMRI-Albinomaus ist die D600-vermittelte Reduktion der Nettofluoreszenz-Ratio bei den transgenen B-Zellen geringer ausgeprägt. Aufgrund der partiellen Depolarisation der SUR1-*k.o.*-B-Zellen unter basalen Bedingungen, ist ebenso eine Fluorchinolon-unabhängige Wirkung in Betracht zu ziehen. Die Beurteilung eines K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effektes gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurde aufgrund des verhältnismäßig hohen Standardfehlers der Nettofluoreszenz-Ratio erschwert. Obgleich die Erhöhung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio bei den getesteten Derivaten signifikant ist (Ergebnisse der einfaktoriellen Anova-Varianzanalyse), könnte neben potentiellen K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Mechanismen im Falle von Gatifloxacin die bereits erwähnte Interferenz zwischen der endogenen Fluoreszenz und der Fura-2-basierten Fluoreszenz (s. Kap. 5.1.5) wesentlich zu dem Effekt beitragen. Im Gegensatz dazu, sind die Effekte des Fluorchinolons Lomefloxacin - wie bei den induzierten Wirkungen gegenüber den B-Zellen der NMRI-Albinomaus - als biologische Reaktionen anzusehen. Für diese Annahme spricht die langsame Kinetik, mit der die Erhöhung der Netto-Fluoreszenz-Ratio als auch die Reduktion der Ratio während der Auswaschphase stattfindet, wohingegen der durch Gatifloxacin initiierte Effekt durch ein auffallend promptes Einsetzen und Aussetzen gekennzeichnet ist.

Insgesamt dokumentieren die Registrierungen, dass die betazytotropen Fluorchinolone in Abwesenheit funktioneller K_{ATP} -Kanäle eine geringe $[Ca^{2+}]_i$ -steigernde Wirkung aufweisen, die für die exozytotische Insulinsekretion keine Relevanz besitzt. Dies konnte durch die ineffizienten Wirkungen der Substanzen auf die Insulinsekretions-Leistung isolierter SUR1-*k.o.*-Inseln bestätigt werden (Pflöger, Diplomarbeit 2006; Şahin, Diplomarbeit, 2007). Hinsichtlich der Zellvitalität könnte die Fluorchinolon-induzierte längerfristige Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, deren zelltoxische Wirkung bekannt ist (Berridge et al., 2003), zu strukturellen Veränderungen der intrazellulären Kompartimente führen. Dieser Prozess wäre als eine Erklärung für die nach einer dauerhaften Gatifloxacin-Exposition beobachtete reversible Vakuolisierung der B-Zelle anzusehen (Jose et al., 2007; Yip und Lee, 2006).

Als grundlegender Mechanismus ist in Bezug auf das Fluorchinolon Gatifloxacin, dessen Wirkung gegenüber den SUR1-*k.o.*-B-Zellen am deutlichsten in Erscheinung trat,

entweder ein K_{ATP} -Kanal-unabhängiger Mechanismus oder die Präsenz mutierter K_{ATP} -Kanäle anzunehmen, die sich ausschließlich aus der porenbildenden $K_{ir}6.2$ -Untereinheit konstituieren. In einer Studie wurde für Gatifloxacin eine inhibitorische Wirkung gegenüber einer trunkierten Form des weiterhin ATP-sensitiven $K_{ir}6.2$ -Kanals nachgewiesen (Saraya et al., 2004). Hier stellt sich jedoch die Frage, ob die Insertion des $K_{ir}6.2$ -Proteins ohne die in der Literatur häufig zitierte Erfordernis einer Co-Expression mit der regulativen SUR1-Untereinheit realisierbar ist. Makhina und Nichols (1998) bestätigen scheinbar diese Möglichkeit durch die Charakterisierung eines homomeren $K_{ir}6.2$ -Kanals, der - entgegen der von Zerangue et al. (1999) postulierten Hypothese einer essentiellen Funktion des SUR1-Proteins für das korrekte *trafficking* der Kanal-Untereinheiten - innerhalb der Plasmamembran nachgewiesen wurde.

5.4 Potentielle Wirkungsmechanismen der betazytotropen bzw. insulinotropen Effekte ausgewählter Fluorchinolone

5.4.1 K_{ATP} -Kanal-abhängiger Mechanismus

Sowohl die effektive Inhibierung des K_{ATP} -Kanals durch die Fluorchinolone C2, Lomefloxacin sowie Gatifloxacin als auch die ineffiziente Wirkung der Derivate C3 und Norfloxacin wurden in *patch clamp*-Analysen belegt. Als Bindungsmotiv wird die porenformende $K_{ir}6.2$ -Untereinheit diskutiert (Saraya et al., 2004; Zünkler und Wos, 2003). Für das fluorphenylierte Fluorchinolon C2 ist aufgrund der vergleichbaren Kinetik und der Intensität der induzierten Effekte sowohl gegenüber der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch dem Membranpotential der isolierten B-Zellen die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals als grundlegender Mechanismus für die Steigerung der Insulinsekretionsrate anzunehmen (s. Abb. 5.4.1). Als Indizien für diese Vermutung sind die ineffiziente betazytotrope Wirkung, die in Abwesenheit funktioneller K_{ATP} -Kanäle (s. Abb. 4.3.2) erzielt werden konnte, und die Abhängigkeit des Ca^{2+} -steigernden Mechanismus von dem Influx exogener Ca^{2+} -Ionen anzusehen. Konform mit diesen Beobachtungen ist die im Rahmen von elektrophysiologischen Messungen für das Fluorchinolon C2 nachgewiesene K_{ATP} -Kanal-inaktivierende Wirkung, deren Ausmaß von den Vertretern der congenen Reihe C1 bis C4 die höchste Effizienz aufwies. Demgegenüber induzierten die Struktur-Analoga C1 und C4 eine moderate bis mäßige Inhibierung, während das Fluorchinolon C3 durch eine sehr geringe Wirkung gegenüber dem K_{ATP} -Kanal gekennzeichnet war (Zünkler et al., 2006).

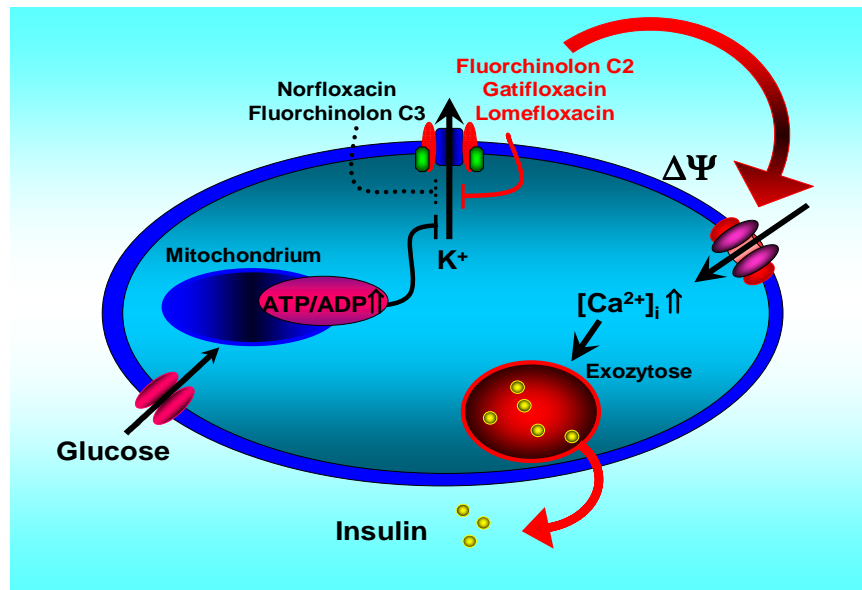


Abbildung 5.4.1 K_{ATP} -Kanal-abhängiger Mechanismus der Fluorchinolone Die insulinotrope Wirkung der Fluorchinolone Lomefloxacin, Gatifloxacin und des fluorphenylierten Fluorchinolons C2 begründet sich durch die nachweisliche Inaktivierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals (Saraya et al., 2004; Züinkler et al., 2006; Züinkler und Wos, 2003). Dieser fungiert nach dem derzeit gültigen Konsensus als Kopplungsglied zwischen dem Energie-Metabolismus und der elektrischen Aktivität der endokrinen B-Zelle. Ineffiziente Wirkungen wurden für die Fluorchinolone C3 und Norfloxacin belegt. Als Bindungsmotiv wird die porenformende $K_{ir}6.2$ -Untereinheit postuliert (Saraya et al., 2004; Züinkler und Wos, 2003).

5.4.2 Glucose-Selektivität der Fluorchinolone

In vorgehenden ratiometrischen Fluoreszenzmessungen sowie Analysen der insulinotropen Wirkung der Fluorchinolone unter *in vitro*-Bedingungen (Pflöger, 2006; Şahin, 2007) wurde offensichtlich, dass der Wirkungsmechanismus einer Glucose-Selektivität unterliegt. Während sich die getesteten Substanzen in Präsenz einer substimulatorischen Glucose-Konzentration von 3 mM bzw. 5 mM (Ashcroft und Rorsman, 1989) als marginal bis gering effizient erwiesen, wurde unter stimulatorischen Bedingungen (10 mM Glucose) ein wesentlich stärkeres Ausmaß sowohl der $[Ca^{2+}]_i$ -Steigerung als auch der Insulinsekretion erzielt (Kriete, Diplomarbeit, 2003; Pflöger, Diplomarbeit 2006). Definitionsgemäß sind Substanzen, die nicht in der Lage sind, in Abwesenheit einer stimulatorischen Glucose-Konzentration die Insulinsekretion zu induzieren, durch eine Selektivität gegenüber Glucose gekennzeichnet. Demgemäß wären die Fluorchinolone nicht wie die Sulfonylharnstoffe als Stimulatoren der Insulinsekretion aufzufassen, sondern als Amplifikatoren der Glucose-induzierten Exozytose des Hormons zu betrachten (Ashcroft und Ashcroft, 1992).

Hier stellt sich die Frage, ob die unter basalen Bedingungen fehlende Effektivität mit der Inhibierung des K_{ATP} -Kanals vereinbar ist oder zusätzliche Signale, die während des

Glucose-Metabolismus generiert werden, erforderlich sind. Eine Substanz-Klasse mit einem vergleichbaren funktionellen Charakter stellen die Imidazolidine dar (Rustenbeck et al., 1999), deren amplifizierende Wirkung auf die Glucose-induzierte Insulinsekretion unter anderem durch die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals über die porenbildende $K_{ir6.2}$ -Untereinheit hervorgerufen wird (Grosse Lackmann et al., 2003; Proks et al., 1997). Für die Fluorchinolone Gatifloxacin und Lomefloxacin wird ebenfalls eine Interaktion mit der funktionellen Einheit des ATP-sensitiven K^+ -Kanals angenommen (Saraya et al., 2004; Züinkler und Wos, 2003), so dass der $K_{ir6.2}$ -Untereinheit eine wichtige Bedeutung für die Glucose-Selektivität zugesprochen werden kann. Zusammenfassend ist die Annahme begründet, dass neben der Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals weitere Signalmechanismen (s. Kap. 5.4.3), die unter anderem während des Glucose-Metabolismus generiert werden, für die effektive Steigerung der Insulinsekretion durch die Fluorchinolone erforderlich sind.

5.4.3 K_{ATP} -unabhängige Signalmechanismen

Aufgrund der für einige Fluorchinolone, unter anderem Levofloxacin und das p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3, nachgewiesenen ineffizienten Inhibierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals (Saraya et al., 2004; Züinkler et al., 2006), sind weitere Wirkungsmechanismen anzunehmen, die einen Beitrag an den dysglykämischen Eigenschaften leisten.

a) **Komplexierung freier Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen:** Begründet durch die relativ hohe Mg^{2+} -Affinität der Fluorchinolone (Ross und Riley, 1992; Förster et al., 1998), sind potentielle Auswirkungen gegenüber der Nukleotid-vermittelten Regulation der K_{ATP} -Kanal-Aktivität als weiterer Mechanismus zu beachten. Die Mg^{2+} -Komplexe sowohl der Nukleosiddiphosphate ADP und GDP (Gribble et al., 1997) sowie der entsprechenden Triphosphate ATP (Gribble et al., 1998) und GTP (Findlay, 1987) bewirken Konzentrations-abhängig eine erhöhte Offenwahrscheinlichkeit. Untersuchungen haben ergeben, dass bei einer physiologischen Mg^{2+} -Konzentration von 0,7 mM ADP zu 45 % als MgADP vorliegt. Es wurde evident, dass die agonistische Wirkung des MgADP von der Hydrolyse des Mg^{2+} -Komplexes an den Nukleotid-bindenden Domänen NBF1 und NBF2 abhängig ist (Gribble et al., 1997). Intrazelluläres ATP führt dagegen unabhängig von Mg^{2+} -Ionen sowohl über die Interaktion mit der $K_{ir6.2}$ -Untereinheit (Tucker et al., 1997) als auch mit dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor SUR1 zu einer Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals (Ueda et al., 1999). Dieser Prozess, der vermutlich über eine Mg^{2+} -unabhängige Bindungsposition an der NBF1-Domäne der SUR1-Untereinheit vermittelt wird, ist durch die Präsenz von MgADP antagonisierbar. Es hat sich gezeigt, dass steigende Konzentrationen des MgADP die ATP-

Sensitivität der $K_{ir6.2}$ -Untereinheit reduziert (Misler et al., 1986). Die Nukleosiddiphosphate ADP und GDP sind in unkomplexierter Form ebenfalls an der Inhibierung der K_{ATP} -Kanal-Aktivität durch Interaktionen mit der $K_{ir6.2}$ -Untereinheit beteiligt (Cook und Hales, 1984).

Zusammenfassend verdeutlicht das sehr komplexe Regulationssystem, welches auf einem kritischen ATP/ADP-Verhältnis sowie der Präsenz freier Mg^{2+} -Ionen und der entsprechenden MgATP- bzw. MgADP-Komplexe basiert, dass durch die Fluorchinolon-induzierte Reduktion der freien Mg^{2+} -Konzentration empfindliche Störungen eintreten könnten. Als Konsequenz wäre eine Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit des K_{ATP} -Kanals und implizit eine erhöhte Insulinsekretion möglich.

Freie Mg^{2+} -Ionen besitzen nicht nur für die Stimulus-Exzitations-Kopplung (Tashiro et al., 2002) bzw. die Stimulus-Sekretions-Kopplung (Ashcroft und Rorsman, 1989) eine zentrale Bedeutung. Ubiquitär fungieren Mg^{2+} -Ionen als essentielle Co-Faktoren zahlreicher ATP-abhängiger Enzyme und Proteinsysteme (Reinhart, 1988). Anzuführen sind unter anderem die verschiedenen Subformen der ATPasen (SERCA, PMCA als Repräsentanten für Ca^{2+} -ATPasen, etc.) sowie zahlreiche Kinasen (CaM-Kinase, etc.). Insbesondere die intrazelläre Ca^{2+} -Homöostase als auch das intrazelluläre ATP/ADP-Verhältnis werden durch die zytosolische Mg^{2+} -Konzentration reguliert. Die Arretierung freier Mg^{2+} -Ionen innerhalb stabiler Chelatkomplexe mit den Fluorchinolonen könnte durch die verminderte Ca^{2+} -Sequestrierung bzw. Ca^{2+} -Ausschleusung über die entsprechenden Ca^{2+}/Na^{+} -ATPasen an der Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beitragen. Zudem wurde gezeigt, dass die Inhibierung der SERCA-vermittelten Ca^{2+} -Kompartimentierung innerhalb des ER sowohl einen potentialabhängigen als auch -unabhängigen Ca^{2+} -Influx stimuliert (Miura et al., 1997). Im Hinblick auf die ATP-Abhängigkeit der Rekrutierung und Aktivierung („*priming*“ und „*docking*“) distaler Sekretgranula, die dem Speicherpool zugeordnet werden (Henquin et al., 2002; Rorsman, 1997), könnte sich ein manifester Mangel an ungebundenen Mg^{2+} -Ionen gleichermaßen ungünstig auf die ATP-Hydrolyse und implizit die Sekretionsleistung der B-Zelle auswirken. Ferner wird Mg^{2+} -Ionen eine relevante Funktion für die Homöostase des Glucose-Metabolismus sowie die Insulinsekretion und die Prävention von Insulin-Resistenzen zugesprochen (Curry et al., 1977; Lefebvre et al., 1994; Paolisso et al., 1990). Darüber hinaus wird von einigen Autoren ein Zusammenhang zwischen einer reduzierten Aktivität der Tyrosin-Kinase des Insulin-Rezeptors und einer reduzierten Mg^{2+} -Verfügbarkeit diskutiert (Suraz et al., 1995).

b) Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor: Interaktionen zwischen den Fluorchinolonen und dem GABA-Rezeptor der Subform A (GABA_A-Rezeptor), der über einen gekoppelten Cl⁻-Kanal inhibitorische Effekte induziert (Norrby, 2003), werden als wesentlicher Auslöser für zentralnervöse Störungen, unter anderem Konvulsionen, angesehen. Erhöhte Inzidenzen für ZNS-toxische Reaktionen wurden für die Vertreter der ersten und zweiten Generation nachgewiesen (von Keutz und Christ, 1998). Insbesondere die Fluorchinolone Fleroxacin, Enoxacin, Ofloxacin und Norfloxacin, die ein unsubstituiertes Piperazyl-Motiv in der C7-Position aufweisen, werden mit einem erhöhten Risiko assoziiert (Akahane et al., 1989). Die allgemein geringe Affinität der Fluorchinolone reduziert sich in der von Tsuji et al. etablierten Rangfolge: Enoxacin > Norfloxacin > Cinoxacin > Ofloxacin > Lomefloxacin (Tsuji et al., 1988). Für Ciprofloxacin und Ofloxacin sowie die Vertreter der dritten und vierten Generation wurden keine signifikanten Interaktionen mit dem GABA_A-Rezeptor nachgewiesen.

In Anbetracht der Tatsache, dass der GABA_A-Rezeptor innerhalb der pankreatischen A-Zelle nachgewiesen wurde (Bailey et al., 2007; Rorsman et al., 1989), ist die Vermutung nahe liegend, dass Interaktionen mit den affinen Fluorchinolonen zu einer Beeinträchtigung der Insulinsekretion führen könnten. Allgemein wird angenommen, dass unter stimulatorischen Bedingungen die Aktivierung des GABA_A-Rezeptors über γ -Aminobuttersäure, deren Expression und Synthese innerhalb der B-Zelle belegt ist (Taniguchi et al., 1979), zu einer Inhibierung der Glucagon-Sekretion und implizit einer Hemmung der Insulinsekretion führt (Bailey et al., 2007). Die kompetitive Inhibierung dieses Signalmechanismus durch die Fluorchinolone könnte die Hemmung der Insulinsekretion unterbinden und in der Konsequenz Hypoglykämien evozieren. Dieser Aspekt ist jedoch unter Vorbehalt zu betrachten, da über die physiologische Bedeutung der GABAergen Regulation der Insulinsekretion kontroverse Meinungen herrschen (Gilon et al., 1991) und zudem das Ausmaß dieses negativen Rückkopplungsmechanismus einer Glucose-Abhängigkeit unterliegt (Dong et al., 2006).

c) Wirkungsmechanismen, die sich außerhalb des endokrinen Pankreas etablieren: Für die hyperglykämische Wirkung der Fluorchinolone Levofloxacin und Gatifloxacin wird ein indirekter, B-Zell-unabhängiger Mechanismus diskutiert, der auf der Histamin-vermittelten als auch direkten Stimulation der Sekretion des Neurotransmitters Epinephrin beruht. Die erhöhte Konzentration des endogenen Sympathimetikums wird, basierend auf der antagonistischen Wirkung gegenüber der Insulinsekretion, als ursächlicher

Faktor für die hyperglykämische Entgleisung der Glucose-Homöostase angesehen (Ishiwata et al., 2006a & b).

5.5 Korrelationen zwischen den experimentellen Ergebnissen und den in der Literatur veröffentlichten Daten

Gatifloxacin (Coblio et al., 2004), Lomefloxacin (Takehiro et al., 2002) und Ciprofloxacin (Fronthingham, 2005) werden konform zu den in dieser Arbeit analysierten biologischen Effekten gegenüber den endokrinen B-Zellen in zahlreichen Studien mit dysglykämischen Ereignissen bzw. Störungen der Insulinsekretion assoziiert. Ferner wurden für das methoxylierte Fluorchinolon Gatifloxacin eine inhibitorische Wirkung gegenüber der Insulin-Biosynthese (Yamada et al., 2006) sowie die Induktion akuter Pankreatitiden beschrieben (Cheung et al., 2004). Diskutiert werden multifaktorielle Mechanismen, von denen die Inhibierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals (Saraya et al., 2004) und die damit einhergehende signifikante Steigerung der Insulinsekretionsrate (Yamada et al., 2006) eine zentrale Rolle spielen. Hinsichtlich der induzierten Hyperglykämien, die sich im Gegensatz zu den hypoglykämischen Symptomen nach einer Latenzphase von drei bis vier Tagen manifestieren, wird die Inhibierung der Insulin-Biosynthese (Yamada et al., 2006) sowie eine progrediente Depletierung des Insulin-Reservoirs (Tomita et al., 2007) als ursächliche Wirkungsmechanismen diskutiert. Interaktionen mit oralen Antidiabetika, unter anderem aus der Klasse der Sulfonylharnstoffe und der Biguanidine, werden ebenfalls als kausale Faktoren für die in einigen Fällen schwerwiegenden Entgleisungen des Glucose-Metabolismus angesehen (Baker und Hangii, 2002; Biggs, 2003). Die von Tomita et al. (2007) unter *in vitro*-Bedingungen ermittelten Befunde verdeutlichen zudem, dass Gatifloxacin in der Lage ist, die hypoglykämische Wirkung der Sulfonylharnstoffe zu potenzieren.

In Anbetracht der limitierten Indikationsstellung des Fluorchinolons Lomefloxacin - einer Konsequenz der phototoxischen Eigenschaften - sind in den vergangenen Jahren nur wenige Fakten über das Sicherheitsprofil veröffentlicht worden. Basierend auf der für Lomefloxacin nachgewiesenen inhibitorischen Eigenschaft gegenüber dem K_{ATP} -Kanal sowie der Fähigkeit, die Insulinsekretion sowohl unter *in vitro*-Bedingungen (Maeda et al., 1998; Pflöger, Diplomarbeit 2006) als auch *in vivo* zu steigern (Hori et al., 2006), ist bei Lomefloxacin von einem erhöhten Risiko für Hypoglykämien auszugehen (Japanese Ministry of Health, Labour und Welfare, 1992).

Hypoglykämische Ereignisse, die in einem Zusammenhang mit dem Fluorchinolon Ciprofloxacin stehen, werden vorwiegend als Konsequenz von Interaktionen mit dem

CYP450-abhängigen Metabolismus oraler Antidiabetika angesehen (Lin et al., 2004; Michalets, 1998; Roberge et al., 2000). In sehr seltenen Fällen sind bei Patienten höheren Lebensalters ohne diabetische Grunderkrankungen Störungen der Glucose-Homöostase symptomatisch aufgetreten (Kendall und Woollorton, 2006). Zudem wurde in experimentellen und klinischen Untersuchungen evident, dass Ciprofloxacin eine moderate Steigerung der Insulinsekretionsrate hervorruft (Gajjar et al., 2000a; Yamada et al., 2006).

Das S-Enantiomer des Racemats Ofloxacin, Levofloxacin, wurde in einer elektrophysiologischen Studie als ineffektiver Inhibitor des ATP-sensitiven K⁺-Kanals charakterisiert (Saraya et al., 2004). Toxische Effekte gegenüber den pankreatischen B-Zellen bzw. den Langerhans-Inseln konnten durch die Ergebnisse präklinischer Studien an Tiermodellen ebenfalls ausgeschlossen werden (Kato et al., 1992). Dennoch sind in der Literatur sowohl hypoglykämische als auch hyperglykämische Ereignisse beschrieben worden, die in einem ursächlichen Zusammenhang mit dem Fluorchinolon gesehen werden (Coblio et al., 2004; Friedrich und Dougherty, 2004; van Bambeke et al., 2005). In einer *post marketing surveillance*-Studie wurde innerhalb eines Zeitraumes von drei Jahren 26 Fälle ernsthafter Dysglykämien registriert, die innerhalb der ersten Woche bei 23 Patienten hypoglykämische Symptome hervorgerufen haben, während bei drei Diabetikern hyperglykämische Entgleisungen der Glucose-Homöostase diagnostiziert wurden. Die dargestellten Kasuistiken verdeutlichten, dass vorwiegend prädisponierte Patienten (Diabetes, Nephropathien) höheren Alters betroffen waren (Yamaguchi et al., 2007). Ein vergleichbares Ergebnis wurde im Rahmen einer Fall-kontrollierten Studie evident, die im Vergleich zu Ciprofloxacin und Moxifloxacin für das Fluorchinolon Levofloxacin eine erhöhte Inzidenz für Störungen der Glucose-Homöostase darlegte (Kendall und Woollorton, 2006). Diese scheinbare Diskrepanz der Datenlage könnte unter anderem durch die von Ishiwata et al. (2006a) unter *in vitro*-Bedingungen beobachtete stimulierende Wirkung des Fluorchinolons sowohl auf die Histamin-Sekretion als auch die Epinephrin-Freisetzung und die damit einhergehende Inhibierung der Insulin-Sekretion erklärt werden. Eine ähnlich Wirkung an physiologisch gesunden sowie diabetischen Ratten wurde für Gatifloxacin nachgewiesen (Ishiwata et al., 2006b). Der Vergleich zwischen den zahlreichen Publikationen dokumentiert jedoch für Gatifloxacin ein höheres Risiko für hypoglykämische Ereignisse (21/1000), während unter der Therapie mit Levofloxacin lediglich bei 11 Patienten von 1000 hypoglykämische Ereignisse induziert wurden (Graumlich et al., 2005).

Die verfügbaren Daten klinischer Studien und Meldungen der Spontan-erfassungssysteme verdeutlichen für das Fluorchinolon Moxifloxacin keine wesentlichen

Beeinträchtigungen der Glucose-Homöostase oder Interferenzen mit der Insulinsekretion. Lediglich in seltenen Fällen sind moderate Formen hyperglykämischer Episoden bei einigen Patienten diagnostiziert worden, die jedoch keine Hospitalisierung erforderlich machten (Gavin et al., 2004; Park-Wyllie et al., 2006). Dieses geringgradige Risiko ist in Anbetracht der ausgeprägten Penetrationsfähigkeit des Fluorchinolons in das Pankreasgewebe des humane Organismus nach einer oralen oder intravenösen Applikation beachtenswert (Wacke et al., 2006). Ferner wurden für die Substanz keine relevanten Interaktionen mit den Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen nachgewiesen (Neves et al., 2007), so dass Interaktionen mit den oralen Antidiabetika aus der Klasse der Sulfonylharnstoffe auszuschließen sind. In Relation zu dem erhöhten dysglykämischen Potential des Fluorchinolons Ciprofloxacin indiziert die ermittelte Datenlage für Moxifloxacin lediglich ein leicht erhöhtes Risiko für Hyperglykämien (Gavin et al., 2004; Kendall und Woollorton, 2006).

Norfloxacin wurde bisher in seltenen Fällen mit Beeinträchtigungen der Glucose-Homöostase assoziiert (Haruhara et al., 2000). Enoxacin, ein Vertreter der ersten Generation, wurde bereits 1996 mit hypoglykämischen Störungen bei Prädisponierten assoziiert (Sakurai et al., 1996). Im Rahmen einer an Mäusen durchgeführten *in vitro*-Studie induzierten Enoxacin sowie Gatifloxacin und Lomefloxacin Hypoglykämien, während Levofloxacin und Ciprofloxacin keinen Einfluss auf den Glucose-Metabolismus bzw. die Insulinsekretion zeigten (Hori et al., 2006).

Zusammenfassend wird deutlich, dass Gatifloxacin von allen analysierten Fluorchinolonen das höchsten Risiko für Störungen des Glucose-Metabolismus aufweist (Graumlich et al., 2005). Demgegenüber wird Norfloxacin mit dem geringsten Risiko assoziiert. Das Sicherheitsprofil entspricht den experimentellen Daten, die weder eine signifikante Depolarisation isolierter B-Zellen bzw. Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals (Zünlker und Wos, 2003) noch eine relevante Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie der Insulinsekretionsrate (Pflöger, Diplomarbeit 2006) indizieren. Therapien mit dem Fluorchinolon Ciprofloxacin sind mit einem moderaten Risiko verbunden, das bei zusätzlichen Prädispositionen, insbesondere bei Patienten höheren Alters und insuffizienter Nierenleistung, vorwiegend zu hypoglykämischen Symptomen führen kann. Das Fluorchinolon Moxifloxacin wird hinsichtlich des dysglykämischen Potentials ebenfalls als sicheres Chemotherapeutikum bewertet (Ball et al., 2004), das lediglich in sehr seltenen Fällen mit hyperglykämischen Episoden assoziiert wurde. Das geringe Risiko korreliert mit den experimentellen Ergebnissen, die weder eine effektive Depolarisation der isolierten B-

Zellen noch eine relevante Amplifizierung der Glucose-induzierten Insulinsekretion (Şahin, Diplomarbeit 2007) belegen konnten.

Das dysglykämische Potential der klinisch relevanten Fluorchinolone reflektiert die experimentell analysierten betazytotropen bzw. insulinotropen Effekte, die über einen weiten Bereich variieren. Demnach scheinen spezifische strukturelle und stereochemische Eigenschaften für diese unerwünschte Wirkung verantwortlich zu sein. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurden die Molekülgeometrie, die Konformation und das elektrostatische Potential der einzelnen Testsubstanzen unter Verwendung eines computergesteuerten, semiempirischen Berechnungsverfahrens charakterisiert.

5.6 Assoziationen zwischen den stereochemischen Eigenschaften der Fluorchinolone und Störungen der Glukose-Homöostase

5.6.1 Struktur-Wirkungs-Beziehung

Für die Bindung der Fluorchinolone an den intermediären Enzym-DNA-Komplex, dem Targetsystem innerhalb sensibler Bakterien-Stämme, ist die Carbonyl-Carboxyl-Sequenz essentiell, die keiner Modifikation unterzogen werden darf (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005). Die Affinität zu der DNA-Gyrase und der Topoisomerase IV wird dagegen durch das Substitutionsprofil gesteuert, wobei die so genannten „*dual target fluoroquinolones*“ mit beiden Subformen der Klasse II-Topoisomerasen signifikante Interaktionen eingehen (Hopper, 2000; Mitscher, 2005).

Die Optimierung des antibakteriellen Spektrums der Fluorchinolone sowie die Reduktion toxischer Effekte erfolgten in der Vergangenheit durch Variationen des Substitutionsprofils in der N1-, C7- und C8-Position. So ermöglichte die Substitution des Halogens in der C8-Position durch eine Methoxy-Gruppe sowohl das phototoxische Potential weitgehend aufzuheben als auch die bakterizide Potenz zu steigern und auf das anaerobe Spektrum zu erweitern (Mitscher und Ma, 2003). Der Austausch des Difluorphenyl-Substituenten in der N1-Position, einem gemeinsamen Strukturmotiv aller Fluorchinolone, die nachweislich schwerwiegende, teilweise letale Wirkungen verursacht haben (Ball, 1995; Brighty und Gootz, 2000), führte zu einem optimierten Sicherheitsprofil. Der Fokus der aktuellen Forschung ist auf die Entwicklung effektiver Tuberkulostatika (Gosling et al., 2003; Yew et al., 2003) sowie therapeutischer Interventionen nosokomialer Infektionen, insbesondere des Respirationstraktes, gerichtet (van Bambeke, 2005). Die Modifizierung der

N1-, C7- und C8-Position und die damit korrelierenden pharmakokinetischen und – dynamischen Vorteile werden in dem einleitenden Kapitel 1.1.3 vorgestellt.

5.6.2 Korrelationen zwischen dem Substitutionsprofil und den experimentellen Ergebnissen

a) N1-Position: Sowohl die effektiv wirksamen Fluorchinolone Lomefloxacin und Gatifloxacin als auch die Substanzen mäßiger bis geringer Effizienz, *i.e.* Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Norfloxacin, sind mit einer Cyclopropyl- bzw. Ethyl-Gruppe substituiert. Strukturelle Unterschiede zeigen sich auf der Ebene des C7-Substituenten, dessen Methylierung (Gatifloxacin, Lomefloxacin) mit einer Steigerung der biologischen Effekte gegenüber den endokrinen B-Zellen bzw. der Insulinsekretion einhergeht.

Im Hinblick auf die Strukturisomere C1 und C2 bzw. C3 und C4 korreliert die Fluorierung des Phenyl-Substituenten in der ortho- oder para-Stellung ebenfalls mit einer divergenten Effizienz: während das o-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 eine ausgeprägte Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und Depolarisation der isolierten B-Zelle hervorruft, ist der Effekt des unmethylierten Analogons C4 lediglich marginal ausgeprägt. Die para-Stellung des Fluoratoms an dem Phenyl-Ring, realisiert bei dem Fluorchinolon C1, ist in Relation zu dem Strukturisomer C2 mit einer geringeren Wirkung verbunden, wobei sich auch in diesem Fall die Präsenz eines 3',4'-Dimethylpiperazin-Motivs förderlich auf das Ausmaß des betazytotropen Effektes auswirkt. Konform mit diesem Ergebnis besitzt das unmethylierte p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C3 im Vergleich zu C1 eine geringe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -steigernde Potenz. Der Vergleich zwischen den congeneren Fluorchinolonen C1 bis C4 und den therapeutischen Fluorchinolonen offenbart, dass die Kombination des o-Fluorphenyl-Substituenten bzw. der Ethyl- oder Cyclopropyl-Sequenz mit einem sterisch anspruchsvollen C7-Substituenten, d.h. einem einfach oder zweifach methylierten Piperazyl-Rest, die betazytotrope Potenz steigert. Die ermittelte Struktur-Wirkungs-Beziehung ist konform mit den experimentell analysierten insulinotropen Eigenschaften (Pflöger, Diplomarbeit 2006; Şahin, Diplomarbeit 2007).

b) C7-Position: Die Substitution des Fluorchinolon-Grundkörpers mit 3'-Methylpiperazin, unter anderem bei den Fluorchinolonen Lomefloxacin und Gatifloxacin verwirklicht, korreliert mit einer effizienten betazytotropen Wirkung. Die Modifizierung der C7-Position mit der gleichen Struktur-Komponente, jedoch in unmethylierter Form, äußert sich bei Ciprofloxacin mit einer deutlichen Verringerung der Wirkstärke. Ein vergleichbarer Zusammenhang resultiert für die fluorphenylierten Fluorchinolone C1 bis C4: die

methylierten Strukturisomere C2 und - in einem geringeren Maße - C1 induzieren sowohl eine effiziente Erhöhung der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch elektrische Stimulation der B-Zellen. Die unmethylierten Analoga C3 und C4 weisen demgegenüber wesentlich geringere Wirkstärken auf, die bei dem Fluorchinolon C4 am geringsten ausgeprägt ist. Eine Sonderstellung nimmt das Fluorchinolon Moxifloxacin ein, das in der C7-Position nicht mit dem bekannten Piperazin-Motiv, sondern mit einem hydrierten 6H-pyrrolo[3,4-b]pyridin-Rest substituiert ist. Angesichts des ansonsten mit Gatifloxacin identischen Substitutionsprofils, scheint diese Strukturkomponente mit einem wesentlich geringeren betazytotropen Potential zu korrespondieren, das sich durch eine marginale Depolarisierung und eine moderate Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration äußert.

c) C8-Position: In Bezug auf das Pendant Lomefloxacin und Norfloxacin korreliert die Präsenz eines zusätzlichen Fluoratoms in der C8-Position mit einer effizienten betazytotropen Wirkung, die für das unfluorierte Analogon Norfloxacin weder in den experimentellen Untersuchungen noch durch Messungen der Insulinsekretion nachgewiesen werden konnte. Die Methoxylierung der C8-Position, einem für die Analoga Gatifloxacin und Moxifloxacin charakteristischen Struktur-Motiv, führt in Kombination mit einem Cyclopropyl-Substituenten sowie einem 3'-Methylpiperazyl-Motiv (Gatifloxacin) zu einer deutlichen Steigerung der betazytotropen bzw. insulinotropen Effizienz, während die Anwesenheit einer unmethylierten, vollständig hydrierten 6H-Pyrrolo[3,4-b]pyridin-Sequenz (Moxifloxacin) die Wirkstärke deutlich reduziert.

5.6.3 Stereochemische und elektrostatische Eigenschaften der Fluorchinolone

Die Ergebnisse der semiempirischen Berechnungen und der Konformationsanalyse (s. Kap. 4.5) lassen bei den betazytotropen Fluorchinolonen und den ineffizient wirksamen Derivaten wesentliche Divergenzen der stereochemischen Eigenschaften erkennen. Das elektrostatische Potential stellt sich bei den beiden Substanz-Gruppen weniger konträr dar, verdeutlicht jedoch die Modifizierung der Ladungsdichteverteilung sowie der Lipophilie durch das Substitutionsprofil. Der Vergleich zwischen den berechneten Molekülgeometrien und den Elektronendichteverteilung lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

1) Diejenigen Fluorchinolone, die sowohl eine effektive Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration als auch eine effiziente Depolarisation der pankreatischen B-Zellen induzieren, weisen als gemeinsame Struktur-Komponente einen methylierten Piperazyl-Substituenten in der C7-Position auf (s. Abb. 5.6.3 (B)). Die insulinotropen Eigenschaften dieser Substanzen, i.e. Lomefloxacin, Gatifloxacin und das Fluorchinolon C2,

sind konform zu den experimentellen Ergebnissen, die den genannten Substanzen effiziente betazytotope Wirkungen zuweisen.

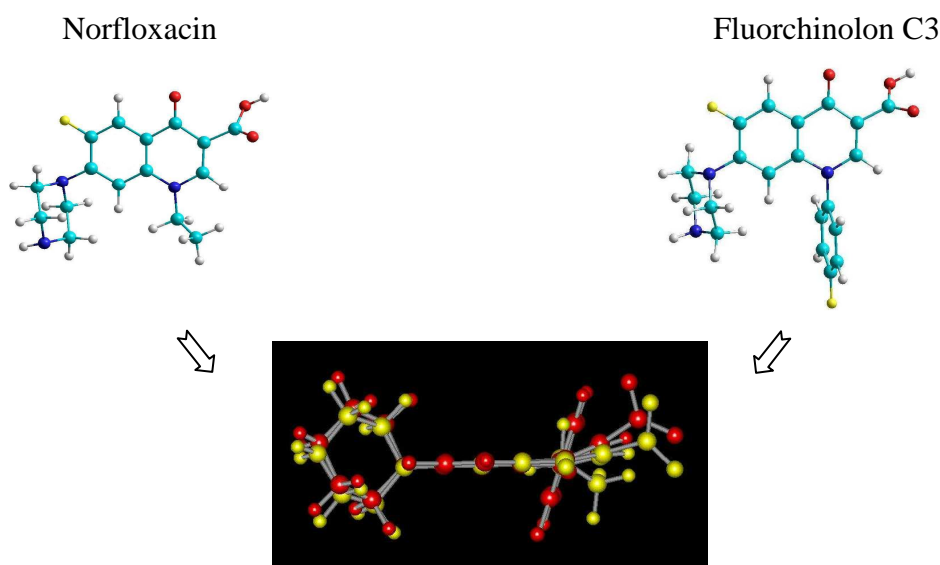


Abbildung 5.6.3 (A) Thermodynamisch begünstigte Molekülgeometrien der ineffizient wirksamen Fluorchinolone C3 und Norfloxacin Die Überlagerung der Molekülstrukturen verdeutlicht die geringe sterische Ausdehnung sowie die vertikale Orientierung des C7-Substituenten zu dem Grundgerüst, die mit einem Torsionswinkel von 80° für Norfloxacin (gelb dargestellt) bzw. 90° für das Fluorchinolon C3 (rot dargestellt) korrespondiert.

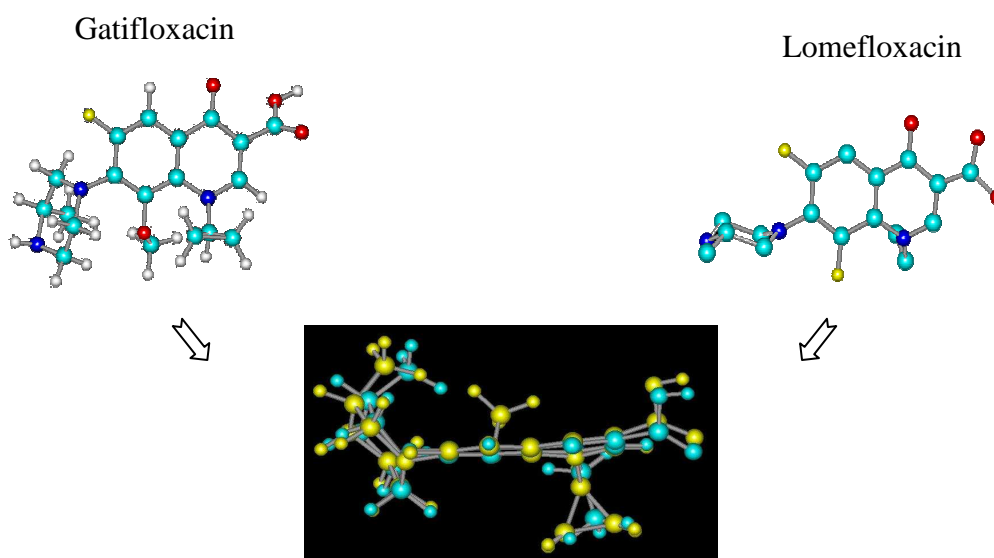


Abbildung 5.6.3 (B) Thermodynamisch begünstigte Molekülgeometrien der insulinotropen Fluorchinolone Gatifloxacin und Lomefloxacin Die Überlagerung der Molekülstrukturen verdeutlicht die umfangreiche sterische Ausdehnung sowie die vertikale Orientierung des C7-Substituenten zu der Molekülachse, die mit einem Torsionswinkel von 210° bzw. 220° korreliert. Die adäquaten räumlichen Verhältnisse der Fluorchinolone Lomefloxacin (blau) und Gatifloxacin (gelb) werden ebenso ersichtlich.

2) Die sterische Ausdehnung der Moleküle wird durch die axiale bzw. equatoriale Methylierung des C7-Substituenten determiniert und ist in Relation zu dem unmethylierten Piperazin-Motiv mit einer deutlich höheren räumlichen Ausdehnung (s. *Abb. 5.6.3 (A) und (B)*) verbunden. Demgemäß sind die insulinotropen Fluorchinolone C2, Lomefloxacin und Gatifloxacin durch einen hohen Raumbedarf gekennzeichnet.

3) Die thermodynamisch begünstigte Konformation der methylierten Fluorchinolone Gatifloxacin, Lomefloxacin und des o-Fluorphenyl-Fluorchinolons C2 korreliert mit einem Torsionswinkel - definiert durch die C2'-N1'-C7-C8-Sequenz - von 210°, 220° bzw. 280°. Die ineffiziente bis geringe Wirkung der Fluorchinolone Norfloxacin und der Strukturisomere C3 und C4 korrespondiert demgegenüber mit Konformationen, die in einem Bereich von 50° bis 90° Energieminima aufweisen. Eine Sonderstellung nimmt das Fluorchinolon Moxifloxacin insofern ein, als dass sowohl in dem Bereich geringgradiger Rotation (100°) als auch erhöhter Rotation (310°) des C7-Substituenten um die C7-N1'-Bindungsachse gleichwertige Energieminima vorliegen. Insgesamt zeigt sich, dass die von dem heterozyklischen C7-Substituenten aufgespannte Ebene bevorzugt diejenige Orientierung einnimmt, welche eine eklyptische bis senkrechte Ausrichtung zu dem 4-Chinolon-Grundgerüst und die Reduktion intramolekularer Wechselwirkungen erlaubt (s. *Abb. 5.6.3 (A)*). Die Methylierung dieser Struktur-Komponente führt zu einer Restriktion der Rotationsfähigkeit, die mit einer weit reichenden Torsion aus der Ebenen des 4-Chinolon-Grundkörpers einhergeht (s. *Abb. 5.6.3 (B)*).

4) Die variable Substitution der C8-Position ist für die Orientierung des C7-Ringsystems zu der Ebene des Grundgerüsts wesentlich, scheint jedoch für die betazytrophe Potenz der Fluorchinolone keine wichtige Voraussetzung darzustellen. Dieser Sachverhalt verdeutlicht sich bei dem Vergleich der $[Ca^{2+}]_i$ -steigernden Effekte sowie der depolarisierenden Effizienz der Fluorchinolone Lomefloxacin, Gatifloxacin und des o-fluorphenylierten Derivates C2, deren Wirkungen ein adäquates Ausmaß erreichen. Alle genannten Substanzen weisen in der C8-Position divergente Substituenten (-OCH₃, -F, -H) auf, die das Ausmaß der Rotation des C7-Substituenten aus der planaren Ebene des Grundgerüsts determinieren. Die Molekülgeometrie der Substanzen Gatifloxacin und Lomefloxacin weist sehr ähnliche Konformationen auf, die in einem Torsionsbereich von 210° bis 220° Energieminima erreichen. Diese eklyptische Anordnung der beiden Ebenen zueinander ist als Konsequenz der eingeschränkten Rotationsfähigkeit um die N1'-C7-Bindungsachse anzusehen, die durch die Präsenz der sterisch anspruchsvollen C7-

Substituenten in Kombination mit der Methoxy-Gruppe bzw. dem Fluoratom in der C8-Position Restriktionen unterliegt. Die energetische Stabilisierung des in der C8-Position unsubstituierten Fluorchinolons C2 korreliert ebenfalls mit einer weit reichenden Rotation der 3',5'-Dimethylpiperazyl-Komponente um 280° aus Ringebene des Grundgerüsts. Insgesamt verdeutlicht sich, dass der Torsionsgrad der beiden Ringebenen um die N1'-C7-Bindungsachse und implizit das Ausmaß der sterischen Ausdehnung durch das Substitutionsprofil in der C7- und C8-Stellung diktiert wird.

5) Die N1-Fluorphenyl-Komponente zeigt keinen Einfluss auf die Molekülgeometrie der Fluorchinolone. Ungeachtet der ortho- oder para-Stellung des Fluoratoms an dem Phenol-Ring orientiert sich der Substituent in einer orthogonalen Ausrichtung zu der Ringebene (Mitscher, 2005).

6) Das elektrostatische Potential der biologisch wirksamen Fluorchinolone sowie der ineffizienten Derivate wird durch das Substitutionsprofil der N1-, C7- und C8-Position determiniert. Bei den methylierten Fluorchinolonen dominiert ein positives elektrostatisches Potential sowie eine erhöhte Lipophilie. Diese Eigenschaft könnte für die Interaktion mit Proteinsystemen eine wichtige Bedeutung besitzen, wie bereits bei Untersuchungen der elektrostatischen Verhältnisse und der Penetrationsfähigkeit gezeigt wurde (Neves et al., 2007). Hinsichtlich der Fluorphenyl-substituierten Fluorchinolone C1 bis C4 manifestieren sich in der Umgebung der Fluoratome Bereiche erhöhter elektrostatischer Anziehung, so dass divergente Elektronendichteverteilungen bzw. elektrostatische Wechselwirkungen resultieren. Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass die ortho-Stellung in Kombination mit einem dimethylierten Piperazyl-Ring dem Fluorchinolon C2 eine höhere Affinität zu dem K_{ATP} -Kanal verleiht als dem Isomer C1. Dieses Phänomen könnte auf die bereits erwähnten lipophilen Eigenschaften hindeuten, die für eine relevante Wechselwirkung vorliegen müssen.

Die Ergebnisse der semiempirisch berechneten Molekülgeometrien sowie der Konformationsanalysen lassen darauf schließen, dass neben den physikochemischen Eigenschaften die Planarität bzw. die sterische Ausdehnung der Fluorchinolone eine zentrale Bedeutung hinsichtlich potentieller Interaktionen mit Rezeptorproteinen einzunehmen scheint. In einigen Studien wurde ein solcher Zusammenhang zwischen der Stereochemie und der Affinität gegenüber Proteinen bzw. Enzymen des Mikro- sowie des Makroorganismus beschrieben. So scheint der Cytochrom P 450-abhängige Metabolismus des Bronchodilatators Theophyllin besonders durch Fluorchinolone mit einer planaren bzw. ebenen Molekül-

geometrie und einem sterisch anspruchslosen C7-Piperazyl-Motiv in der unmethylierten Form (Enoxacin und Norfloxacin) antagonisiert zu werden (Mizuki et al., 1996). Hinsichtlich potentieller Interaktionen der Fluorchinolone mit dem zentralnervösen GABA_A-Rezeptor, einem ursächlichen Mechanismus für Fluorchinolon-induzierte Störungen des ZNS (Norrby, 2003), wird eine gleichartige Struktur-Wirkungs-Beziehung postuliert. Gemäß den derzeitigen Vorstellungen führen Piperazyl-abgeleitete Substituenten mit einem hohen Raumbedarf zu einer sterischen Abschirmung des Bindungsmotivs an dem Rezeptor und implizit zu einer Verringerung der Bindungskapazität (Akahane et al., 1989; Ball, 2003; Domagala, 1994).

5.6.4 Zusammenhang zwischen der Affinität zu dem K_{ATP}-Kanal bzw. dem K_{HERG}-Kanal und den strukturellen Eigenschaften ausgewählter Fluorchinolone

a) **K_{ATP}-Kanal-Affinität:** Obwohl in den letzten Jahren intensive Untersuchungen im Rahmen von *in vivo*- und *in vitro*-Studien durchgeführt wurden, ist der verantwortliche Wirkungsmechanismus für die in einigen Fällen schwerwiegende Entgleisung des Glukose-Metabolismus weitgehend unbekannt. Es gelang jedoch, für die Fluorchinolone Terafloxacin, Lomefloxacin und Gatifloxacin (s. Abb. 5.6.4.1) Affinitäten zu der funktionellen Untereinheit K_{ir}6.2 des ATP-sensitiven K⁺-Kanal der endokrinen β -Zellen nachzuweisen, während für Norfloxacin und Levofloxacin eine signifikante inaktivierende Potenz ausgeschlossen werden konnte (Saraya et al., 2004; Zünkler und Wos, 2003). In einer weiteren Studie wurde die inhibitorische Wirkung des Fluorchinolons Sparfloxacin mit der inaktivierenden Wirkung der in dieser Arbeit untersuchten congenen Fluorphenyl-Fluorchinolone C1 bis C4 miteinander verglichen. Die Resultate wiesen die Substanz C2 als effektivsten Inhibitor aus, während Sparfloxacin sowie die Derivate C1 und C4 vergleichbar moderate inaktivierende Wirkungen hervorriefen. Konform mit den hier vorgestellten Ergebnissen und den ermittelten Sekretionsdaten (Pflöger, 2006) zeigte das Fluorchinolon C3 die geringste Affinität zu dem K_{ATP}-Kanal (Zünkler et al., 2006).

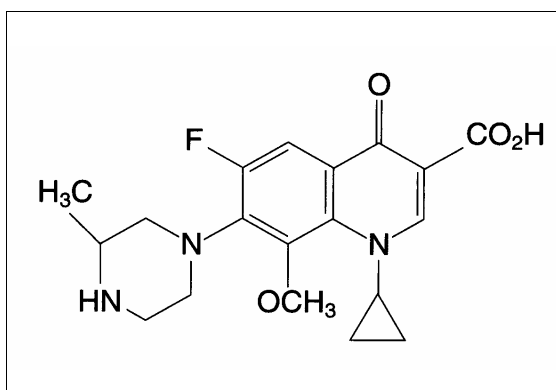


Abbildung 5.6.4.1 Inhibitor des K_{ATP}-Kanals Gatifloxacin induziert eine effiziente Inaktivierung des ATP-sensitiven K⁺-Kanals der pankreatischen B-Zellen (Saraya et al., 2004). Die Affinität gegenüber dem cardiac-len K_{HERG}-Kanal zeigt demgegenüber eine moderate Ausprägung (Kang et al., 2001).

Auf struktureller Ebene sind alle biologisch wirksamen Substanzen durch eine einfache bzw. zweifache Methylierung des C7-Piperazyl-Substituenten gekennzeichnet. Die fehlende Effektivität des Fluorchinolons Sparfloxacin (s. Abb. 5.6.4.2), das sich lediglich durch die Anwesenheit einer zweiten Methyl-Gruppe an dem Piperazyl-Motiv sowie einer Amino-Funktion in der C5-Position von Lomefloxacin differenziert, verdeutlicht den sehr komplexen Charakter der Interaktionen. Dementsprechend sind nicht nur strukturelle Variationen des Grundkörpers zu berücksichtigen, sondern ebenso die stereochemischen Verhältnisse in dem Molekül und das elektrostatische Potential (Chidangil et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion der Fluorchinolone mit biologischen Systemen chirale Eigenschaften (Brighty und Gootz, 2000), das elektrostatische Potential und die Komplexierung bivalenter Ionen entscheidend sind (Mitscher, 2005; Neves et al., 2007).

b) Effekte gegenüber dem K_{HERG} -Kanal: Die kardiotoxische Wirkung einiger Fluorchinolone wird ebenfalls durch die Inaktivierung eines spezifischen K^+ -Kanals hervorgerufen. Die durch Prolongationen des QT-Intervalls ausgelösten Tachykardien, die sich in kritischen Situationen zu Torsade-de-point-Arrhythmien steigern können, basieren auf der Inhibierung des spannungsabhängigen K_{Herg} -Kanals aus der Klasse der „delayed rectifier“ (Anderson et al., 2001, Bischoff et al., 2000; Kang et al., 2001, Yap und Camm, 2003). Dieser Kanal wird durch das „human ether-à-go-go-related gen“ *HERG* codiert und entspricht der schnellen Komponente des verzögert gleichrichtenden K^+ -Stroms I_{Kr} der Kardiomyozyten (Sanguinetti et al., 1995), der für die Repolarisation und Determinierung des QT-Intervalls entscheidend ist. Die Ergebnisse der zitierten Studien belegen für das zweifach methylierte und in der C8-Position halogenierte Fluorchinolon Sparfloxacin (s. Abb. 5.6.4.2) sowie den einfach methylierten Vertreter Grepafloxacin signifikante inhibitorische Effekte. Mit einer geringeren Potenz verursachten die in der C8-Position methoxylierten Fluorchinolone Gatifloxacin und Moxifloxacin Störungen der Kanal-Aktivität (Kang et al., 2001).

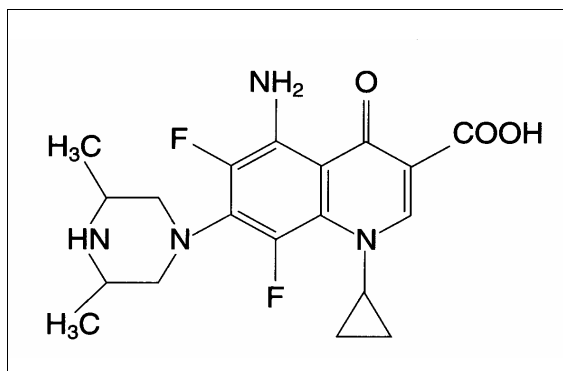


Abbildung 5.6.4.2 Inhibitor des K_{HERG} -Kanals Sparfloxacin, ein potenter Antagonist des kardialen K_{HERG} -Kanals (Katritsis und Camm, 2003), ist ebenso wie Grepafloxacin durch eine geringe Affinität zu dem ATP-sensitiven K^+ -Kanal der pankreatischen B-Zelle gekennzeichnet (Züinkler et al., 2006).

Demgegenüber zeigten die mit sterisch anspruchslosen, unmethylierten C7-Substituenten modifizierten Derivate Ciprofloxacin, Norfloxacin sowie das trizyklische Fluorchinolon Ofloxacin und das S-Enantiomer Levofloxacin sehr geringe Affinitäten zu dem Proteinsystem des K_{HERG} -Kanals (Anderson et al., 2001; Kang et al., 2001).

Um eine signifikante Inaktivierung der Organ-spezifischen K^+ -Kanal-Subformen zu verursachen, scheinen dementsprechend divergente stereochemische Eigenschaften und Struktur-Komponenten erforderlich zu sein. Darauf lassen die im Rahmen von *patch-clamp*-Messungen ermittelten Resultate schließen, die weder für Lomefloxacin noch für die Fluorphenyl-Fluorchinolone C1 bis C4 signifikante inhibitorische Effekt gegenüber dem K_{HERG} -Kanal indizieren (Zütkler et al., 2006). Diese Beobachtung ist konform mit der allgemeinen Vorstellung, dass die Substitution der C5-Position in einem engen Zusammenhang mit der Affinität zu dem K_{HERG} -Kanal und der Prolongierung des QT-Intervalls steht (Lode und Rubinstein, 2005; Smith und Lomaestro, 2003). Auffallend ist in diesem Zusammenhang, dass die effektiven Inhibitoren des spannungsabhängigen K_{HERG} -Kanals, *i.e.* Sparfloxacin, Grepafloxacin, Gatifloxacin und Moxifloxacin, in der N1-Position einen Cyclopropyl-Rest aufweisen.

Interessanterweise zeichnen sich die Fluorchinolone durch eine hohe Selektivität aus, so dass sich die Interaktionen auf die in den β -Zellen der Langerhans-Inseln exprimierten $K_{\text{ir}6.2/\text{SUR1}}$ -Subform des K_{ATP} -Kanals (Lomefloxacin, Gatifloxacin, Clinafloxacin) oder auf dem K_{Herg} -Kanal der Kardiomyozyten (Sparfloxacin, Grepafloxacin, Moxifloxacin) limitieren. Dieser Sachverhalt deutet auf das Erfordernis einer komplexen Molekülstruktur mit spezifischen stereo- und physikochemischen Eigenschaften hin. Diesbezüglich scheinen sterisch anspruchsvolle Sequenzen mit lipophilen Eigenschaften - methylierte C7-Piperazyl-Reste oder voluminöse 4-Aminopyrrolidin-Komponenten in Kombination mit Fluorphenyl-, Cyclopropyl- oder Ethyl-Substituenten an dem vinylogenen N1-Stickstoffatom - für Interaktionen prädestiniert zu sein. Die zusätzliche Modifizierung der C8-Position könnte sich förderlich auf einen blockierenden Mechanismus auswirken, scheint jedoch - wie bei Temafloxacin und dem hier untersuchten Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 offensichtlich wurde - nicht obligatorisch zu sein.

Basierend auf diesen Ausführungen scheint die Qualität und die Intensität der biologischen Aktivität im Wesentlichen durch das Substitutionsmuster und die stereochemischen Verhältnisse in dem Molekül beeinflusst zu werden. Dies könnte erklären, weshalb bei dem Fluorchinolon Gemifloxacin hyperglykämische Effekte dominieren

(Genesoft Pharmaceuticals, 2003; Owens, 2005, Owens und Ambrose, 2005), wohingegen bei anderen Vertretern (Clinafloxacin, Lomefloxacin, Temafloxacin, Gatifloxacin) hypoglykämische Ereignisse im Vordergrund stehen. Als Ausdruck für derartige substantielle Änderungen der pharmakodynamischen Eigenschaften durch geringfügige Variationen der Molekülstruktur, ist die geringe Affinität des Fluorchinolons Sparfloxacin gegenüber dem K_{ATP} -Kanal zu werten, dessen Substitutionsprofil scheinbar alle Kriterien eines potentiellen Inhibitors erfüllt.

5.6.5 Strukturelle Gemeinsamkeiten der mit Störungen der Glucose-Homöostase assoziierten Fluorchinolone

a) Substitutionsprofil: Bei dem Vergleich des dysglykämischen Potentials derjenigen Fluorchinolone, die in der Literatur häufig in einem Zusammenhang mit schwerwiegenden Störungen zitiert werden, sind strukturelle Gemeinsamkeiten feststellbar. Auffallend ist bei zahlreichen Vertretern, *i.e.* Temafloxacin, Clinafloxacin, Lomefloxacin Gatifloxacin, ein sterisch anspruchsvoller Substituent in der C7-Position. Für die Fluorchinolone Temafloxacin (Norrby et al., 1993; von Keutz und Christ, 1998), Clinafloxacin (Shailer et al., 1997; Rubinstein, 2001), Lomefloxacin (Rubinstein 2001; Takehiro et al., 2002) und Gatifloxacin (Graumlich et al., 2005; Mohr et al., 2005) konnten ursächliche Zusammenhänge nachgewiesen werden, die in der Konsequenz zu der Aufhebung der rechtlichen Zulassung oder Restriktionen der Indikationsstellung geführt haben. Eine Sonderstellung nimmt das Fluorchinolon Clinafloxacin ein, einem Vertreter der vierten Generation (Brighty und Gootz, 2000), der aufgrund massiver Entgleisungen des Glukose-Metabolismus bereits in der klinischen Phase 3 zurückgezogen wurde (Solomkin et al., 1998). Das in der C7-Stellung mit einem 3'-Aminopyrrolidin-Substituenten modifizierte Chinolon führte in klinischen Studien der Phase II und III zu einer ausgeprägten Steigerung der Insulin-Konzentration (ausgehend von basalen Werten um 165 % bis 235 %), die sich als äquipotente Verringerung der Glucose-Konzentration (47 % bis 51 %) manifestierte (Shailer et al., 1997). Im Rahmen von Placebo-kontrollierten Studien wurde Clinafloxacin signifikant häufig (4 % versus 1,1 %) mit Hypoglykämien assoziiert (Welling und Burke, 1999). In Relation zu dem Fluorchinolon Moxifloxacin, dem ein erhöhtes Sicherheitsprofil zugesprochen wird (Ball et al., 2004), scheint die Substitution der Methoxy-Gruppe durch ein Chloratom und die Reduktion der 6*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-Sequenz um drei C-Atome zu einem 3-Amino-Pyrrolidin-Rest hinreichend zu sein, um das toxische Potential erheblich zu steigern (s. Abb. 5.6.5). Gatifloxacin, das unter den Fluorchinolonen bezüglich des dysglykämischen Risikos

ebenfalls eine herausragende Stellung einnimmt, differenziert sich von Clinafloxacin ebenfalls in der C7- und C8-Stellung. Im Gegensatz zu Moxifloxacin wird der C7-Substituent jedoch durch einen methylierten Piperazyl-Ring dargestellt, dessen Präsenz mit einer Steigerung des toxischen Potentials korreliert. Dementsprechend scheint sich auch hier zu bestätigen, dass die Kombination aus einem voluminösen C7-Substituenten, einer lipophilen N1-Cyclopropyl-Sequenz und einer modifizierten C8-Position bedeutungsvoll ist.

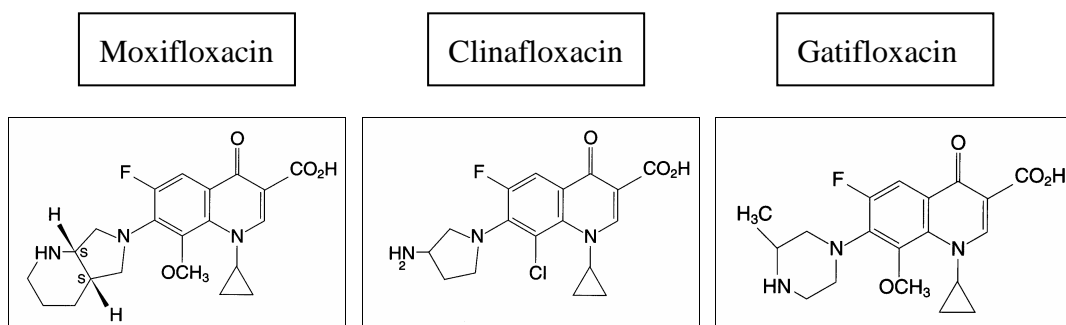


Abbildung 5.6.5 Vergleich zwischen den N1-Cyclopropyl-Fluorchinolonen Moxifloxacin, Clinafloxacin und Gatifloxacin Das unterschiedliche Substitutionsprofil in der C7- und C8-Position korreliert mit einem divergenten hypoglykämischen Risiko.

Die experimentell untersuchten Fluorchinolone Lomefloxacin, Norfloxacin und Ciprofloxacin weisen keine relevante Struktur-Analogie zu Clinafloxacin auf. Strukturelle Ähnlichkeiten liegen jedoch zwischen Terafloxacin und den congenen Fluorchinolonen C1 und C2 vor. Der Vergleich zwischen dem insulinotrop wirksamen Fluorchinolon C2 bzw. dem moderat effizienten Isomer C1 und Terafloxacin, die als gemeinsame Struktur-Komponenten eine methylierte C7-Piperazyl-Sequenz sowie einen Fluorphenyl-Substituenten in der N1-Position aufweisen, lässt die Vermutung zu, dass die ortho-Stellung des Fluoratoms an dem Phenol-Ring zu einem erhöhten Risiko beiträgt. Diese Sequenz, die sich bevorzugt orthogonal zu dem Grundgerüst orientiert, könnte in Kombination mit anderen kritischen Faktoren (elektrostatisches Potential, Lipophilie, etc.) das Risiko für Störungen des Glukose-Metabolismus erhöhen. Hinsichtlich der Modifizierung der C7-Stellung lassen die Ergebnisse der mikrofluorimetrischen Messungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration sowie der parallel durchgeführten Messungen der Insulinsekretion die Annahme zu, dass die Methylierung des C7-Piperazyl-Substituenten den Fluorchinolonen insulinotrope Eigenschaften verleiht (Pflöger, Diplomarbeit 2006).

Für die endgültige Beurteilung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, die für Störungen der Glukose-Homöostase eine kritische Bedeutung besitzen, ist das gesamte Substitutionsprofil der einzelnen Fluorchinolone zu berücksichtigen. In der Vergangenheit

wurde evident, dass zwischen dem aliphatischen N4'-Stickstoffatom des C7-Heterozyklus, dem Carbonyl-Motiv in der C4-Position und der Carboxyl-Funktion in der C3-Position der Fluorchinolone komplexe inter- und intramolekulare Wechselwirkungen auftreten, die sich modifizierend auf den pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Charakter auswirken.. Das vinyloge N1-Stickstoffatom scheint dagegen bevorzugt lipophile bzw. hydrophobe Wechselwirkungen einzugehen (Mitscher, 2005; Chidangil et al., 2004). Das Substitutionsprofil der N1-, C7- und C8-Position determiniert die azidobasischen Eigenschaften (Ross an Riley, 1992) die Lipophilie, das elektrostatische Potential sowie die Stereochemie der einzelnen Derivate (Brighty und Gootz, 2000; Mitscher, 2005).

b) 4-Chinolon-Grundkörper: Die sehr komplexen intramolekularen Wechselwirkungen zwischen den Substituenten des 4-Chinolon-Grundkörpers und die damit einhergehenden physikochemischen Eigenschaften (pK_a -, MEP-, K_d -Werte, etc.) begründen bei einer kritischen Konstellation die Affinitäten zu spezifischen Geweben oder zellulären Proteinsystemen des Makroorganismus. In diesem Zusammenhang sollte der Fokus auf das 4-Chinolon-Grundgerüst gerichtet werden, einem Strukturmotiv, das bei einigen prominenten K_{ATP} -Kanal-Effektoren in modifizierter Form vertreten ist. Anzuführen sind die inhibitorisch wirkenden Antimalaria-Therapeutika Chinin, Chloroquin und Mefloquin, deren Grundkörper durch ein Chinolin bzw. 4-Chinolon repräsentiert wird - an dieser Stelle sei erwähnt, dass sich die Leitsubstanz der Fluorchinolone von dem Virustatikum Chloroquin ableitet. Messungen des Glucose-Plasmaspiegels, der Insulin-Konzentration sowie des C-Peptids haben ergeben, dass Chloroquin bei physiologisch Gesunden zu einer signifikanten Verringerung der Glucose-Konzentration unter Bedingungen des Ruhemetabolismus führt. Zudem wurden bei nicht-insulinpflichtigen Diabetikern während einer Chloroquin-Therapie eine verringerte Glucose-Toleranz sowie hypoglykämische Ereignisse nachgewiesen (Smith et al., 1987). Als Bindungsmotiv der genannten Antimalaria-Therapeutika wird die $K_{ir}6.2$ -Untereinheit postuliert (Doyle and Egan, 2003).

Als unselektiver Aktivator des K_{ATP} -Kanals ist Diazoxid anzuführen, das als isosterisches Analogon des 4-Chinolons auffassen ist. Von diesem Benzothiadiazin-Derivat wurden zwei 4-Chinolon-Derivate abgeleitet, die in der C6-Position durch ein Chlor- oder ein Fluoratom gekennzeichnet sind. Diese Strukturanaloga induzierten in Abhängigkeit von dem Halogen eine selektive Aktivierung des K_{ATP} -Kanal der endokrinen β -Zellen, wobei das chlorierte Isomer eine deutlich höhere aktivierende Potenz aufwies (Becker et al., 2001). Auch hier könnte - wie für das 4*H*-Tautomer des Benzothiadiazins Diazoxid erkannt wurde (de Tullio et al., 1996) - die NH-Sequenz des 1*H*-Tautomers für die biologische Aktivität

relevant sein. An dieser Stelle sei angemerkt, dass durch den isosterischen Austausch des SO₂-N-Motivs durch eine CO-CH-Sequenz die Priorität des N-Atoms und dementsprechend die Zählweise verändert wird. Es wird außerdem vermutet, dass die Chlorierung der C6-Position im Vergleich zu dem Fluoratom mit einer höheren Lipophilie sowie einem optimierten elektrochemischen Potential einhergeht.

Diese Ergebnisse lassen eine grundlegende Bedeutung des planaren 4-Chinolon-Grundgrüstes für die Interaktion mit den heterogenen Untereinheiten des tetradimeren SUR1/K_{IR}6.2-Kanalkomplexes erkennen, das möglicherweise die Grundvoraussetzung für die Reaktion mit dem K_{ATP}-Kanal darstellt. Als Indiz für diese Hypothese könnte die bereits mit der Ursubstanz Nalidixinsäure, repräsentiert durch die N1-ethylierte 4-Oxo-1,8-naphthyridin-3-Carbonsäure, assoziierten Hypoglykämien angesehen werden (Kucers und Bennett, 1975). Durch die Ethylierung des vinylogenen Stickstoffatoms erfährt das 4*H*-Tautomer eine Stabilisierung, so dass auch hier die für die Interaktion mit den Kanalproteinen kritische NH-Sequenz (de Tullio et al., 1996) in modifizierte Form vertreten ist. In Bezug auf die Selektivität der 4-Chinolon-Derivate, scheint das Substitutionsmuster und implizit die räumliche Ausdehnung die Affinität gegenüber der funktionellen K_{ir}6.2-Untereinheit und möglicherweise der regulatorischen SUR1-Untereinheit zu modulieren.

Es lässt sich resümieren, dass von allen peripheren Substituenten insbesondere die N1- und C7-Sequenz die Affinität der Fluorchinolone zu biologischen Systemen determinieren. Nach den derzeitigen Vorstellungen über die Struktur-Wirkungs-Beziehung (Domagala, 1994; Rubinstein, 2003; Stahlmann und Lode, 1999) steuert die Strukturkomponente in der C7-Position die Bindungskapazität an den Cytochrom P 450-abhängigen Monooxygenasen, dem GABA_A- sowie dem NMDA-Rezeptor des ZNS. Das Strukturmotiv in der N1-Stellung ist demgegenüber für Interaktionen mit den Zellen des Immunsystems und anderen differenzierten Zelltypen des Makroorganismus verantwortlich. Fluorchinolone mit einem 2',4'-Difluorphenyl-Motiv sind mit einer auffallend hohen Inzidenz für schwerwiegende toxische Reaktionen, unter anderem hepatoxische Reaktionen und Hepatitiden (Trovafloracin, 1998), dem hämolytisch-urämischen Syndrom sowie Hypoglykämien (Temafloracin, 1991) und eosinophilen Pneumonitiden (Tosufloxacin, 1990), assoziiert worden. Einige Autoren sehen daher ein Korrelat zwischen diesem Strukturmotiv und der erhöhten zytotoxischen Potenz (Domagala und Hagen, 2003; Mitscher, 2005; Owens und Ambrose, 2005). Die Substituenten der C5- und C8-Position besitzen eine zentrale Bedeutung für die Induktion phototoxischer und genophototoxischer Reaktionen. Lediglich

die C2- und die C6-Position des Grundgerüsts wurden bisher nicht mit unerwünschten Reaktionen assoziiert.

6. Zusammenfassung

Fluorchinolone sind antimikrobielle Chemotherapeutika, die im Gegensatz zu anderen Antibiotika-Klassen immer noch einer kontinuierlichen Weiterentwicklung unterzogen werden. Zunehmende Bedeutung besitzen die Vertreter der vierten und dritten Generation für die Therapie nosokomialer Infektionen und der Tuberkulose. Bedingt durch die sehr gute Penetrationsfähigkeit in die epidermalen Gewebe, haben sich Fluorchinolone ebenfalls für die Therapie des diabetischen Fußsyndroms sowie infizierter Druckgeschwüre etabliert (Peterson et al., 1989). Zudem scheinen Fluorchinolone das Risiko für koronare Herzerkrankungen und Atherosklerosen bei Typ II Diabetikern zu reduzieren (Erkens et al., 2002).

Nachdem zu Beginn der therapeutischen Anwendung toxische Wirkungen gegenüber dem Makroorganismus aufgrund der für Prokaryonten selektiven Toxizität nahezu ausgeschlossen wurden, hat sich mit der zunehmend breiteren Anwendung im Verlauf der letzten zwanzig Jahre ein weites Spektrum an unerwünschten Reaktionen mit zum Teil schwerwiegenden bis letalen Folgen herausgestellt. Zu derart toxischen Reaktionen gehören Störungen der Glucose-Homöostase, die sich sowohl als Hypoglykämien sowie als hyperglykämische Entgleisungen des Metabolismus während einer Fluorchinolon-Therapie manifestiert haben. Die nachweislich von einigen Substanzen dieser Chemotherapeutika-Klasse induzierten hypoglykämischen Ereignisse, die im Vergleich zu Hyperglykämien ein wesentlich höheres Gefährdungspotential darstellen, haben bereits zum Tode einiger Patienten geführt. Gemäß der aktuellen Datenlage wird eine gesteigerte Insulinsekretion und die mit damit korrelierende Inaktivierung des ATP-sensitiven K^+ -Kanals (K_{ATP} -Kanal) der pankreatischen B-Zellen als ursächlicher Mechanismus für die Induktion massiver Hypoglykämien angesehen. Ein solcher Wirkungsmechanismus müsste allerdings regelhaft zu einer gesteigerten Sekretionsrate des hypoglykämisch wirksamen Hormons Insulin und implizit zu einer weitaus höheren Inzidenz für derartige Störungen der Glucose-Homöostase führen. Insofern scheint die Aufklärung der Stimulus-Sekretions-Kopplung bezüglich der Fluorchinolone noch unbefriedigend. Die Identifizierung der grundlegenden Wirkungsmechanismen der Fluorchinolone gegenüber den pankreatischen B-Zellen ist demgemäß unter zwei Perspektiven bedeutungsvoll:

- 1) Die Aufklärung der Struktur-Wirkungs-Beziehung ermöglicht die Entwicklung neuartiger Fluorchinolone ohne hypoglykämisches Gefährdungspotential.

- 2) Die therapeutische Nutzung der insulinotropen Eigenschaften der Fluorchinolone für die Entwicklung Glucose-selektiver Antidiabetika.

Als Parameter, der unmittelbar für die exozytotische Insulinsekretion relevant ist, sollte die freie zytosolische Ca^{2+} -Konzentration isolierter und primär kultivierter B-Zellen des Pankreas analysiert werden. Die resultierenden Daten über die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -modulierenden Eigenschaften der Fluorchinolone dienten als Ergänzung zu den in einem anderen Projekt ermittelten Wirkungen der Substanzen auf die Insulinsekretion, so dass potentielle Effekte, die Beeinträchtigungen der Glucose-Homöostase hervorrufen, unter verschiedenen Aspekten analysiert werden konnten.

Aufgrund der endogenen Fluoreszenzeigenschaften der Fluorchinolone war es jedoch nicht möglich, das etablierte fluoreszenzmikroskopische Verfahren mit dem ratiometrischen Ca^{2+} -Indikator Fura-2 in der herkömmlichen Weise durchzuführen. Die zunächst vermutete Interferenz mit der Fura-2-basierten Fluoreszenzemission wurde durch die spektrofluorimetrische Charakterisierung der intrinsischen Fluoreszenz aller untersuchten Fluorchinolone bestätigt: Sowohl auf der Ebene der Exzitations- als auch der Emissionsspektren zeigten sich Überlagerungen mit den Fluoreszenzeigenschaften des Indikators Fura-2. Dies betraf vor allem die in Gegenwart des Perifusionsmediums registrierten Exzitationsmaxima (340 nm bis 360 nm) und die korrespondierenden Emissionsmaxima (410 nm bis 430 nm), die in dem für die ratiometrischen Fluoreszenzmessungen relevanten Spektralbereich lokalisiert waren. Zudem wurde offensichtlich, dass bei den methoxylierten Fluorchinolonen Moxifloxacin und Gatifloxacin hinsichtlich der besonders langwelligen Fluoreszenzemission (470 nm bzw. 460 nm) von einer zusätzlichen Erhöhung der Fura-Fluoreszenz-Ratio auszugehen war.

Aufgrund der erfolgreichen und validen Anwendung der ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie, die bereits in zahlreichen Arbeiten für die Untersuchung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und deren regulatorische Mechanismen intensiv genutzt wurde, und sich zudem andere Indikatoren als problematisch erwiesen haben, wurde ein geeignetes Korrekturverfahren entwickelt. Dieses basierte auf der Subtraktion der Fluorchinolon-emittierten Fluoreszenz von der Fura-2-emittierten Bruttofluoreszenz, so dass jeder Versuch zweifach durchzuführen war: zunächst wurden Fura-2-inkubierte B-Zellen mit den Testsubstanzen umströmt und sukzessiv schein-inkubierte B-Zellen unter identischen Bedingungen perfundiert. Die erfolgreiche Dissoziation zwischen der endogenen Fluoreszenzemission und der Ca^{2+} -abhängigen Fura-Fluoreszenz-Ratio wurde dadurch belegt, dass der Ca^{2+} -Kanal-Inhibitor Methoxyverapamil (D600) unter diesen Bedingungen in der

Lage war, die Fluorchinolon-induzierte Steigerung der Nettofluoreszenz-Ratio effektiv zu antagonisieren und demgemäß vollständig aufzuheben. Weder die Kinetik noch die Intensität der K^+ -evozierten Depolarisation, dem internen Standard der Messungen, wurden durch die Bildung der Fura-Nettofluoreszenz-Ratio beeinträchtigt. Demzufolge war es möglich, die Wirkung ausgewählter Fluorchinolone, deren insulinotrope Eigenschaften im Rahmen von Sekretionsmessungen bereits charakterisiert worden waren, auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu beurteilen.

Die Struktur-Analoga Lomefloxacin und Norfloxacin sowie Gatifloxacin und Moxifloxacin bzw. Ciprofloxacin wiesen in dieser Hinsicht deutliche Unterschiede auf. In einer Konzentration von 100 μM waren die Fluorchinolone Gatifloxacin, Lomefloxacin und Moxifloxacin durch die höchste Effektivität gekennzeichnet: das Ausmaß der $[Ca^{2+}]_i$ -stimulierenden Wirkung entsprach dem Plateau der K^+ -induzierten Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Ciprofloxacin führte demgegenüber zu einem moderaten Effekt, dessen Ausmaß lediglich 50 % der K^+ -Depolarisation erreichte. Norfloxacin zeigte von allen untersuchten Derivaten die geringste Effizienz.

Der Zusammenhang zwischen geringfügigen strukturellen Variationen und der biologischen Wirksamkeit der Testsubstanzen wurde durch die Analyse der congeneren fluorphenylierten Fluorchinolone C1, C2, Sarafloxacin (C3) und C4 deutlich. Das p-Fluorphenyl-Fluorchinolon C2 induzierte einen ausgeprägten $[Ca^{2+}]_i$ -steigernden Effekt, während die Wirkung des Strukturisomers C1 eine geringfügig verminderte Intensität erzielte. Im Gegensatz dazu verursachten die an dem Piperazin-Ring unmethylierten Strukturisomere C3 und C4 lediglich eine mäßige bis geringe Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration.

Die Frage, ob die $[Ca^{2+}]_i$ -stimulierende Wirkung letztlich als indirekte Konsequenz der inhibitorischen Wirkung der Fluorchinolone gegenüber dem K_{ATP} -Kanal aufzufassen ist, wurde durch die Analyse K_{ATP} -Kanal-defizienter B-Zellen der SUR1-*k.o.*-Maus näher untersucht. Aufgrund der effizienten betazytotropen Wirkung wurden die Fluorchinolone Lomefloxacin, Gatifloxacin und das o-fluorphenylierte Derivat C2 ausgewählt. Es zeigte sich, dass die Abwesenheit funktioneller K_{ATP} -Kanäle mit einem deutlichen Wirkungsverlust korrelierte. Dennoch konnten sowohl für Gatifloxacin als auch für Lomefloxacin signifikante Steigerungen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration identifiziert werden. Bedingt durch die ineffiziente Wirkung der Substanzen auf die Insulinsekretion der aus SUR1-*k.o.*-Mäusen isolierten Inseln, scheinen die $[Ca^{2+}]_i$ -steigernden Effekte nicht in einem für die Exozytose relevanten Kompartiment stattzufinden.

Die Messung des Membranpotentials in der konventionellen *whole cell*-Konfiguration der *patch clamp*-Technik belegen für alle analysierten Fluorchinolone depolarisierende Eigenschaften. Die Wirkstärke zeigte jedoch in Abhängigkeit von der Substanz ein divergentes Ausmaß. In Relation zu dem depolarisierenden Effekt des K_{ATP} -Kanal-Inhibitors Tolbutamid lassen sich wesentliche Differenzen feststellen: *i*) die Wirkung der Fluorchinolone tritt mit einer deutlich verzögerten Kinetik ein, *ii*) die induzierte Depolarisation ist durch Auswaschen nicht oder nur partiell reversibel und *iii*) der K_{ATP} -Kanal-Aktivator Diazoxid ist auch in einer maximal effektiven Konzentration nicht in der Lage, die depolarisierende Wirkung zu antagonisieren. Demzufolge unterscheidet sich der Wirkungsmechanismus der Fluorchinolone von den Mechanismen anderer Substanzen, die den ATP-sensitiven K^+ -Kanal ebenfalls an der porenbildenden Untereinheit $K_{ir6.2}$ blockieren. Insgesamt verringerte sich die Effektivität der Fluorchinolone in einer Konzentration von 50 μM in der folgenden Rangfolge:

Gatifloxacin > Fluorchinolon C2, Ciprofloxacin > Lomefloxacin,
Fluorchinolon C1 und C3 > Fluorchinolon C4, Norfloxacin > Moxifloxacin

Die Ergebnisse der semiempirischen Berechnungen der Molekülgeometrie weisen auf spezifische strukturelle Charakteristika hin, die mit der betazyotropen Wirkung assoziiert sind. Eine zentrale Rolle nimmt diesbezüglich die Methylierung des C7-Substituenten ein, in der Regel durch eine Piperazin-Ring dargestellt, die mit einer erhöhten räumlichen Ausdehnung und Rotation des C7-Substituenten um die C7-N1'-Bindungsachse aus der Ebene des 4-Chinolon-Grundkörpers korreliert. Im Vergleich dazu ist die 6*H*-Pyrrolo[3,4-*b*]pyridin-Sequenz des Fluorchinolons Moxifloxacin durch eine geringe sterische Ausdehnung charakterisiert. Die Modifizierung der C8-Position ist ebenfalls kritisch zu betrachten, vor allem in enger Nachbarschaft zu einem voluminösen C7-Substituenten, da alle Fluorchinolone mit relevanter biologischer Wirkung gegenüber den endokrinen B-Zellen und der Insulinsekretion eine Methoxy-Gruppe (Gatifloxacin) bzw. ein Halogenatom (Lomefloxacin und Clinafloxacin, das nicht in die Untersuchungen einbezogen wurde) in dieser Position aufweisen. Darüber hinaus ist das Fluorphenyl-Motiv in der N1-Position für die Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung bedeutungsvoll, wobei die Fluorierung der ortho- bzw. para-Stellung das elektrostatische Potential und damit verbunden potentielle Interaktionen mit biologischen Systemen determiniert. In zahlreichen Publikationen wurde diese Struktur-Komponente in einem ursächlichen Zusammenhang mit spezifischen toxischen Effekten der Fluorchinolone betrachtet. Im Gegensatz zu diesen Korrelaten sind die ineffektiven

Derivate, zum Beispiel Norfloxacin und Moxifloxacin, durch die Abwesenheit sterisch anspruchsvoller Methyl-Gruppen an dem C7-Substituenten und implizit einer geringen räumlichen Ausdehnung gekennzeichnet. Zudem liegt die C8-Position in der Regel in einem unsubstituierten Zustand vor. An dieser Stelle sollte jedoch betont werden, dass die einzelnen Substituenten nicht isoliert voneinander zu betrachten sind, sondern vielmehr das gesamte Substitutionsprofil zu berücksichtigen ist.

Prinzipiell induzierten alle analysierten Fluorchinolone eine Depolarisation pankreatischer B-Zellen und führten zu einer Steigerung der freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Insofern könnte die Auslösung hypoglykämischer Ereignisse tatsächlich auf eine Inhibierung des K_{ATP} -Kanals zurückzuführen sein. Bei genauerer Betrachtung ergeben sich jedoch Diskrepanzen: Moxifloxacin bewirkte eine ebenso deutliche Steigerung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wie Gatifloxacin, ist jedoch nicht mit einer adäquaten Inzidenz für tödliche Hypoglykämien assoziiert. Umgekehrt wurde für Norfloxacin eine ineffiziente $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -stimulierende Wirkung nachgewiesen, dennoch wurden Hypoglykämien während einer Norfloxacin-Therapie hervorgerufen. Es scheinen deshalb noch nicht identifizierte Mechanismen zu existieren, mit denen Fluorchinolone pankreatische B-Zellen in ihrer Aktivität beeinflussen. Die Inaktivierung des K_{ATP} -Kanals und die nachfolgende Initiierung des *triggering pathway* scheint demnach eine notwendige, jedoch nicht hinreichende Bedingung für die Steigerung der Insulinsekretion und implizit die hypoglykämischen Effekte der Fluorchinolone zu sein. Darauf deutet ebenso die Glucose-Selektivität der Substanz-Klasse als auch das ungewöhnliche depolarisierende Verhalten hin.

Literaturverzeichnis

- Aguilar-Bryan, L., J.P. Clement IV, G. Conzalez, K. Kunjilwar, A. Babenko und J. Bryan (1998). Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP}-channels. *Physiol. Rev.* 78: 227-245.
- Ahrén, B. (2005). Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 2078-2084.
- Ahrén, B., G.Y. Taborsky und D. Porte (1986). Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion. *Diabetologia* 29: 827-836.
- Ahrén, B. und G.J. Jr. Taborsky (1986). The mechanism of vagal nerve stimulation of glucagon und insulin secretion in the dog. *Endocrinology* 118: 1551-1557.
- Akahane, K., M. Sekiguchi, T. Une und Y. Osada (1989). Structure relationship of quinolones with special reference to their interaction with γ -aminobutyric acid receptor sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1704-1708.
- Alvarez-Leefmans, F.J., F. Giraldez und S.M. Gamino (1987). Intracellular free magnesium in excitable cells: ist measurement and its biologic significance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 65: 915-925.
- Andersson, M.I. und A.P. MacGowan (2003). Development of the quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (Suppl. S1): 1-11.
- Anderson, M.E., A. Mazur, T. Yang und D.M. Roden (2001). Potassium current antagonist properties and proarrhythmic consequences of quinolone antibiotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296: 806-810.
- Andriole, V.T (2005). The quinolones: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis.* 41 (Suppl. 2): 113-119.
- Andriole, V.T. (1999). The Future of the quinolones. *Drugs* 58 (Suppl. 2): 1-5.
- Antunes, C.M., A.P. Salgado, L.M. Rosário und R.M. Santos (2000). Differential patterns of glucose-induced electrical activity and intracellular calcium responses in single mouse and rat pancreatic islets. *Diabetes* 49: 2028-2038.
- Applebaum, P.C. und P.A. Hunter (2000). The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int. J. Antibacter. Agents* 5: 5-15.
- Arce, C.A., S.R.S. Bhasin und R.M. Pasmantier (2004). Severe Hyperglycemia during gatifloxacin therapy in patients without diabetes. *Endocr. Pract.* 10: 40-44.
- Ashcroft, F.M. und F.M. Gribble (1999). ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 8: 903-919.
- Ashcroft, F.M. und S.J.H. Ashcroft (1992). Mechanism of insulin secretion. In: *Insulin. Molecular biology to pathology*. Hrsg. v. Ashcroft, F.M. und S.J.H. Ashcroft. Oxford University Press, New York.
- Ashcroft, F.M., F.D. Harrison und S.J.H. Ashcroft (1984). Glucose induced closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta cells. *Nature* 312: 446-448.

- Ashcroft, F.M. und P. Rorsman (1989). Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 54: 87-143.
- Ashcroft, S.J.H. (1980). Glucoreceptor mechanisms and the control of insulin release and biosynthesis. *Diabetologia* 18: 5-15.
- Atwater, I., D. Mears und E. Rojas (1996). Electrophysiology of the pancreatic B-cell. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Hrsg. v. LeRoith, D. und S.I. Taylor. Lippincott, Philadelphia.
- Bailey, S.J., M.A. Ravier und G.A. Rutter (2007). Glucose-dependent regulation of gamma-aminobutyric acid (GABA A) receptor expression in mouse pancreatic islet alpha-cells. *Diabetes* 56: 320-327.
- Baillyes, E., P.C. Guest und J.C. Hutton (1992). Insulin synthesis. In: *Insulin. Molecular biology to pathology*. Hrsg. v. Ashcroft, F.M. und S.J.H. Ashcroft. Oxford University Press, New York.
- Baker, S.E. und M.C. Hangii (2002). Possible gatifloxacin-induced hypoglycaemia. *Ann. Pharmacother.* 36: 1722-1726.
- Ball, P., R. Stahlmann, R. Kubin, S. Choudhri und R. Owens (2004). Safety profile of oral and intravenous moxifloxacin: cumulative data from clinical trials and postmarketing studies. *Clin. Therapeutics* 26: 940-950.
- Ball, P. (2003). Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (Suppl. S1): 21-27.
- Ball, P. und G. Tillotson (1995). Tolerability of fluoroquinolone antibiotics. Past, present and future. *Drug Safety* 13: 343-358.
- Balfour, J.A. und B. Wiedemann (1999). Moxifloxacin. *Drugs* 57: 363-420.
- Barg, S. (2003). Mechanisms of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol. Toxicol.* 92: 3-13.
- Barg, S., X. Ma, L. Eliasson, J. Galvanovskiy, S.O. Göpel, S. Obermüller, J. Platzer, E. Renström, M. Trus, D. Atlas, J. Striessnig und P. Rorsman (2001). Fast exocytosis with few Ca^{2+} -channels in insulin-secreting mouse pancreatic B-cells. *Biophys. J.* 81: 3308-3323.
- Barg, S., J. Galvanovskis, S.O. Göpel, P. Rorsman und L. Eliasson (2000). Tight coupling between electrical activity and exocytosis in mouse glucagon-secreting α -cells. *Diabetes* 49: 1500-1510.
- Becker, B., M.H. Antoine, Q.A. Nguyen, B. Rigo, K.E. Cosgrove, P.D. Barnes, M.J. Dunne, P. Pirotte und P. Lebrun (2001). Synthesis and characterization of a quinolonic compound activating ATP-sensitive K^{+} channels in endocrine and smooth muscle tissues. *B. J. Pharmacol.* 134: 375-385.
- Bedoya, F.J., J.M. Wilson, A.K. Gosh, D. Finegold und F.M. Matschinsky (1986). The glucokinase glucose sensor in human pancreatic islets tissue. *Diabetes* 35: 61-67.
- Bergmann, A. et al. (2005). Multiple-dose administration of MK-0431, a dipeptidyl dipeptidase IV inhibitor, in healthy male subjects. *65th Scientific Session of the American Diabetes Association. Abstracts* 54 (Suppl. 1): 2100-PO.

- Bergsten, P., E. Grapengiesser, E. Gylfe, A. Tengholm und B. Hellman (1994). Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 269: 8749-8753.
- Berridge, M.J., M.D. Bootman und H. Llewelyn Roderick (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Mol. Cell Biol.* 4: 517-529.
- Bertrand, G., N. Ishiyama, M. Nenquin, M.A. Ravier und J.C. Henquin (2002). The elevation of glutamate content and the amplification of insulin secretion in glucose-stimulated pancreatic islets are not causally related. *J. Biol. Chem.* 277: 32883-32891.
- Berts, A., E. Gylfe und B. Hellman (1995). Ca^{2+} oscillations in pancreatic islet cells secreting glucagon and somatostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 644-649.
- Best, L. (2002). Evidence that the glucose-induced electrical activity in rat pancreatic b-cells does not require K_{ATP} channel inhibition. *J. Membr. Biol.* 185: 193-200.
- Biggs, W.S. (2003). Hypoglycemia and hyperglycemia associated with gatifloxacin use in elderly patients. *J. Am. Board Fam. Pract.* 16: 455-457.
- Bischoff, U., C. Schmidt, R. Netzer et al. (2000). Effects of fluoroquinolones on HERG currents. *J. Eur. Pharmacol.* 406: 341-344.
- Bleck, C., A. Wienbergen und I. Rustenbeck (2005). Essential role of the imidazoline moiety in the insulinotropic effect but not the K_{ATP} channel-blocking effect of imidazoline; a comparison of the effects of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R. *Diabetologia* 48: 2567-2575.
- Blum, M.D., D.J. Graham und C.A. McCloskey (1994). Temafloxacin syndrome: review of 95 cases. *Clin. Infect. Dis.* 18: 946-950.
- Bokvist, K., L. Eliasson, C. Ämmälä, E. Renström und P. Rorsman (1995). Co-localisation of L-type Ca^{2+} channels and insulin-containing secretory granules and its significance for the initiation of exocytosis in mouse pancreatic B-cells. *EMBO J.* 14: 50-57.
- Brighty, K.E. und T.D. Gootz (2000). Chemistry and mechanism of action of the quinolone antibacterials. In: *The quinolones; 3rd Edition. Hrsg. v. Andriole, V.T. Academic Press, San Diego.*
- Bruning, J.C., D. Gautam, D.J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P.C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Muller-Wieland und C.R. Kahn (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.
- Burkhardt, J.E., J.N. Walterspiel und U.B. Schaad (1997). Quinolone arthropathy in animals versus children. *Clin. Infect. Dis.* 25: 1196-1204.
- Champoux, J.J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 369-413.
- Chidangil, S., M.K. Shukla und P.C. Mishra (2004). A molecular electrostatic potential mapping study of some fluoroquinolone antibacterial agents. *J. Mole. Model.* 4: 250-258.

- Chen, C.R., M. Malik, M. Snyder und K. Drlica (1996). DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 258: 627-637.
- Cheung, O., K. Chopra, T. Yu et al (2004). Gatifloxacin-induced hepatotoxicity and acute pancreatitis. *Ann. Intern. Med.* 140: 73-74.
- Coblio, N.A., K. Mowrey, P. McCright, H. Means und M.T. McCormick (2004). Use of a data warehouse to examine the effect of fluoroquinolones on glucose metabolism. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 61: 2545-2548.
- Cook, D.L. und C.N. Hales (1984). Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311: 271-273.
- Coore, H.G. und P.J. Randle (1964). Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem. J.* 93: 66-78.
- Craig, W.A. und D.R. Andes (2003). Pharmacodynamics of quinolone antimicrobial agents. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.*
- Creutzfeldt, W. (1979). The incretin concept today. *Diabetologia* 16: 75-85.
- Critchlow, S.E. und A. Maxwell (1996). DNA cleavage is not required for binding of quinolone drugs to the DNA gyrase-DNA complex. *Biochemistry* 35: 7387-7393.
- Curry, D.L., R.M. Joy, D.C. Holley und L. Bennett (1977). Magnesium modulation of glucose-induced insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* 101: 203-208.
- Dale, K.M., K. Lertsburapa, J. Kluger et al (2007). Moxifloxacin and torsade de pointes. *Ann. Pharmacother.* 41: 336-340.
- Dean, F., M. Krasnow, R. Otter, M. Matzuk, S. Spengler und N. Cozzarelli (1983). *Escherichia coli* type I topoisomerases: identification, mechanism and role in recombination. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47: 769-777.
- Dean, F.M. und E.K. Matthews (1970). Glucose-induced electrical activity in pancreatic islet cells. *J. Physiol.* 210: 255-264.
- Detimary, P., M. Nenquin und J.C. Henquin (1994). Two sites of glucose control of insulin release with distinct dependence of the energy state in pancreatic B-cells. *Biochem. J.* 297: 455-461.
- Dewar, M.J.S. und W. Thiel (1977). Ground states of molecules. The MNDO method. Approximations and parameters. *J. Am. Chem. Soc.* 99: 4907-4917.
- Dewar, M.J.S., E.G. Zebisch, E.F. Healy und J.J.P. Stewart (1985). AM1: a new general purpose quantum molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 3902-3909.
- Dodson, G. und D. Steiner (1998). The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 189-194.
- Doliba, N.M., W. Qin, M.Z. Vatamaniuk, C. Li, D. Zelent, H. Najafi, C.W. Buettger, H.W. Collins, R.D. Carr, M.A. Magnuson und F.M. Matschinsky (2004). Restitution of defective glucose-stimulated insulin release of sulfonylurea type 1 receptor knockout mice by acetylcholine. *Am. J. Physiol.* 286: E834-E843.

- Domagala, J.M. und S.E. Hagen (2003). Structure-activity relationships of quinolone antibacterials in the new millennium: some things change and some do not. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.*
- Domagala, J.M. (1994). Review: structure-activity and structure-side effect relationships for the quinolone antibacterials. *J. Antimicrob. Chemother.* 33: 685-706.
- Domagala, J.M., L.D. Hanna, C.L. Heifetz, M.P. Hutt, T.F. Mitch, J.P. Sanchez und M. Solomon (1986). New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *J. Med. Chem.* 29: 394-404.
- Dong, H., M. Kumar, Y. Zhang, A. Gyulkhandanyan, Y.Y. Xiang, B.Y.J. Perrella, A. Hyder, N. Zhang, M. Wheeler, W.Y. Lu und Q. Wang (2006). Gamma-aminobutyric acid up- and downregulates insulin secretion from beta cells in concert with changes in glucose concentration. *Diabetologia* 49: 697-705.
- Dorman, S.E. und R.E. Chaisson (2007). From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Medicine* 13: 295-298.
- de Tullio, P., B. Pirotte, P. Lebrun, J. Fontains, L. Dupont, H.M. Antione, R. Ouedraogo, S. Khelili, C. Maggetto, B. Masereel, O. Diouf, T. Podona und J. Delarge (1996). 3- and 4-substituted 4*H*-Pyrido[4,3-*e*]-1,2,4-thiadiazine-1,1-dioxides as potassium channel openers: synthesis, pharmacological evaluation and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 39: 937-948.
- Doyle, M.E. und J.M. Egan (2003). Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol. Rev.* 55: 105-131.
- Drlica, K. und X.I. Zhao (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 377-392.
- Drlica, K. und D.C. Hooper (2003). Mechanism of quinolone action. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.*
- Drucker, D.J. und M.A. Nauck (2006). The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* 368: 1696-1705.
- Dudley, M.N. (2003). Pharmacokinetics of fluoroquinolones. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.*
- Dunne, M.J., E.A. Harding, J.H. Jagger und P.E. Squires (1994). Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 6-12.
- Dunne, M.J., J.A. West-Jordan, R.J. Abraham, R.H.T. Edwards und O.H. Petersen (1988). The gating of nucleotide-sensitive K⁺-channels in insulin-secreting cells can be modulated by changes in the ratio ATP⁴⁻/ATP³⁻ and by non-hydrolysable analogues derivatives of both ATP and ADP. *J. Membr. Biol.* 104: 165-167.

- Dunne, M.J., M.C. Illot und O.H. Peterson (1987). Interaction of diazoxide, tolbutamide and ATP⁴⁻ on nucleotide-dependent K⁺ channels in an insulin-secreting cell line. *J. Membr. Biol.* 99: 214-224.
- Dunne, M.J. und O.H. Petersen (1986). Intracellular ADP activates K⁺-channels that are inhibited by ADP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett.* 208: 59-62.
- Emmerson, A.M. und A.M. Jones (2003). The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (Suppl. S1): 13-20.
- Erkens, J.A., O.H. Klungel, R.M.C. Herings, R.P. Stolk, J.A. Spoelstra, D.E. Grobbee und H.G.M. Leufkens (2002). Use of fluoroquinolones is associated with a reduced risk of coronary heart disease in diabetes mellitus type 2 patients. *Eur. Heart J.* 23: 1575-1579.
- Falagas, M.E., P.I. Rafailidis und E.S. Rosmarakis (2007). Arrhythmias associated with fluoroquinolone therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29: 374- 379.
- Ferrero, L., B. Cameron, B. Manse, D. Lagneaux, J. Crouzet, A. Famechon und F. Blanche (1994). Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol. Microbiol.* 13: 641-653.
- Findlay, I. (1987). The effects of magnesium upon adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in a rat insulin-secreting cell line. *J. Physiol.* 391: 611-629.
- Förster, C., M. Rücker, M. Shakibaei, I. Baumann-Wilschke, J. Vormann und R. Stahlmann (1998). Effects of fluoroquinolones and magnesium deficiency in murine limb bud cultures. *Arch. Toxicol.* 72: 411-419.
- Förster, C., K. Kociok, M. Shakibaei, H.J. Merker, J. Vormann, T. Günther und R. Stahlmann (1996). Integrins on joint cartilage chondrocytes and alterations by ofloxacin or magnesium deficiency in immature rats. *Arch. Toxicol.* 70: 261-270.
- Frankel, B.J., I. Atwater und G.M. Grodsky (1981). Calcium affects insulin release and membrane potential in islet beta-cells. *Am. J. Physiol.* 240: 64-72.
- Fresta, M., S. Guccione, A.R. Beccari, P.M. Furnerich und G. Puglisib (2002). Combining molecular modelling with experimental methodologies: mechanism of membrane permeation and accumulation of ofloxacin. *Biorg. Med. Chem.* 10: 3871-3889.
- Friedrich, L.V. und R. Dougherty (2004). Fatal hypoglycemia associated with levofloxacin. *Pharmacotherapy* 24: 1807–1812.
- Frothingham, R. (2005). Glucose homeostasis abnormalities associated with use of gatifloxacin. *Clin. Infect. Dis.* 9: 1269-1276.
- Frothingham, R. (2004). Gatifloxacin associated with a 56-fold higher rate of glucose homeostasis abnormalities than comparator quinolones in the FDA spontaneous reporting database. Abstract A-1092. *Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC.*

- Fukuda, H., R. Kishii und M. Hosaka (2001). Contributions of the 8-methoxy group of gatifloxacin to resistance selectivity, target preference and antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1549-1553.
- Gajjar, D.A., F.P. LaCreta, G.D. Kollia, R.R. Stolz, S. Berger, W.B. Smith, M. Swingle und D.M. Grasela (2000a). Effect of multiple-dose gatifloxacin or ciprofloxacin on glucose homeostasis and insulin production in patients with noninsulin dependent diabetes mellitus maintained with diet and exercise. *Pharmacotherapy* 20: 76-86.
- Gajjar, D.A., F.P. LaCreta, H.D. Uderman et al. (2000b). A dose-escalation study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of intravenous gatifloxacin in healthy adult men. *Pharmacotherapy* 20: 49-58.
- Gavin, J.R. 3rd, R. Kubin, S. Choudhri, D. Kubitza, H. Himmel, R. Gross und J.M. Meyer (2004). Moxifloxacin and glucose homeostasis: a pooled-analysis of the evidence from clinical and postmarketing studies. *Drug Saf.* 27: 671-686.
- Gellert, M., M.H. O'Dea, K. Mizuuchi und H. Nash (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3872-3876.
- Gembal, M., P. Detimary, P. Gilon, Z.Y. Gao und J.C. Henquin (1993). Mechanism by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphat-sensitive K^+ channels in mouse b-cells. *J. Clin. Invest.* 91: 871-880.
- Gembal, M., P. Gilon und J.C. Henquin (1992). Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse b-cells. *J. Clin. Invest.* 89: 1288-1295.
- Genesoft Pharmaceuticals (2003). Factive (gemifloxacin) package insert. *South San Francisco, CA*.
- Gilon, P., J.C. Jonas und J.C. Henquin (1994). Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 37: 1007-1014.
- Gilon, P., R.M. Shepherd und J.C. Henquin (1993). Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} as evidences in single pancreatic islets. *J. Biol. Chem.* 268: 22265-22268.
- Gilon, P. und J.C. Henquin (1992). Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca^{2+} concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic B-cell. *J. Biol. Chem.* 267: 20713-20720.
- Gilon P., G. Bertrand, M.M. Loubatieres-Mariani, C. Remacle und J.C. Henquin (1991). The influence of gamma-aminobutyric acid on hormone release by the mouse and rat endocrine pancreas. *Endocrinology* 129: 2521-2529.
- Gotoh, M., T. Maki, T. Kiyozumi, S. Satomi und A.P. Monaco (1985). An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40: 437-438.

- Goss, W.A., W.H. Deitz und D.M. Cook (1965). Mechanism of action of nalidixic acid on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 89: 1068-1074.
- Gosling, R.D., L.O. Uiso, N.E. Sam et al. (2003). The bactericidal activity of moxifloxacin in patients with pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168: 1342-1345.
- Grapengiesser, E., E. Gylfe und B. Hellman (1988). Glucose-induced oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} in the pancreatic β -cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 1299-1304.
- Graumlich, J.F., S. Habis, R.R. Avelino, S.M. Salverson, M. Gaddamanugu, K. Jamma und J.C. Aldag (2005). Hypoglycemia in inpatients after gatifloxacin or levofloxacin therapy: nested case-control study. *Pharmacotherapy* 25: 1296-1302.
- Gregorio, F., F. Ambrose, S. Cristallini, M. Pedetti, F. Filipponi und F. Santeusano (1992). Therapeutical concentrations of tolbutamide, glibenclamide, glicazide and gliquidone at different glucose levels in vitro effects on pancreatic α - and β -cell function. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 18: 197-206.
- Gribble, F.M., S.J. Tucker, T. Haug und F.M. Ashcroft (1998). MgATP activates the beta cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7185-7190.
- Gribble, F.M., S.J. Tucker und F.M. Ashcroft (1997). The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO* 16: 1145-1152.
- Grodsky, G.M. (1996). Kinetics of insulin secretion: current implications. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Hrsg. v. LeRoith, D. and S.I. Taylor. Lippincott, Philadelphia.
- Grodsky, G.M. (1989). A new phase of insulin secretion. How will it contribute to our understanding of beta-cell function? *Diabetes* 38: 673-678.
- Grodsky, G.M., A.A. Batts, L.L. Bennett, C. Vcella, N.B. McWilliams und D.F. Smith (1963). Effects of carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas. *Am. J. Physiol.* 205: 638-644.
- Grohe, K. und H. Heitzer (1987). Synthese von 1-Amino-4-chinolon-3-carbonsäuren. *Liebigs Ann. Chem.* 29: 871-879.
- Grosse Lackmann, T., B.J. Zünkler und I. Rustenbeck (2003). Specificity of nonadrenergic imidazoline binding sites in insulin-secreting cells and relation to the block of ATP-sensitive K-channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1009: 371-377.
- Grube, D., I. Eckert, P.T. Speck und H.J. Wagner (1983). Immunohistochemistry and microanatomy of the islets of Langerhans. In: *Brain-gut axis*. Hrsg. v. Fujito, T., T. Kanno und N. Yanaihara. *Biomed. Res.* 4 (Suppl.): 25-36.
- Gryniewicz, G., M. Poenie und R.Y. Tsien (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450.

- Guay, D.R.P. (2005). Quinolones. In: *Drug interactions in infectious diseases*. 2nd Edition. Hrsg. v. Piscitelli, S. C. und K. A. Rodvold. Human Press Inc., New Jersey.
- Gurwitz, JH (2006). Serious adverse drug effects - seeing the trees through the forest. *Massachusetts Medical Society, Boston*. Available from URL: <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMe068051v1.pdf>.
- Gylfe, E. (1989). Glucose-induced buffering of cytoplasmic Ca^{2+} in the pancreatic β -cell – an artifact or a physiological phenomenon? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159: 907-912.
- Gylfe, E. (1988). Glucose-induced early changes in cytoplasmic calcium of pancreatic beta-cells studied with time-sharing dual-wavelength fluorometry. *J. Biol. Chem.* 263: 5044-5048.
- Gylfe, E. und B. Hellman (1987). External ATP mimics carbachol in initiating calcium mobilization from pancreatic b-cells conditioned by previous exposure to glucose. *Brit. J. Pharmacol.* 92: 281-289.
- Hamill, O.P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann und F.J. Sigworth (1981). Improved patch clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100.
- Happe, M.R., B.P. Mulhall, C.L. Maydonovitch und K.C. Holtzmuller (2004). Gatifloxacin-induced hypoglycaemia. *Ann. Intern. Med.* 141: 968-969.
- Haruhara, N., H. Niwa, S. Kitayama und N. Sakai (2000). Two cases of drug-induced hypoglycemic coma. *J. Tomakomai City General. Hosp.* 14: 45-48.
- Haugland, R. (1993). Intracellular ion indicators. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis*. Hrsg. v. Mason, W.T. Academic Press Inc., San Diego.
- Hawkey, P.M. (2003). Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* 51 (Suppl. S1): 29-35.
- Heisig, P. und B. Wiedemann (2001). Wirkungs- und Resistenzmechanismen der Chinolone. *Pharm. Unserer Zeit* 30: 382-393.
- Hellman, B., E. Gylfe, E. Grapengiesser, P.E. Lund und A. Marcström (1992). Cytoplasmic Ca^{2+} and insulin secretion. In: *Nutrient Regulation of Insulin Secretion*. Hrsg. v. Flatt, P.R. Portland Press, London.
- Hellman, B. (1967). Islet morphology and glucose metabolism in relation to the specific function of the pancreatic B-cells. *Excerpta Med. Int. Congr. Ser.* 172: 92-109.
- Henquin, J.C., N. Ishiyama, M. Nenquin, M.A. Ravier und J.C. Jonas (2002). Signals and pools underlying biphasic insulin secretion. *Diabetes* 51 (Suppl. 1): 60-67.
- Henquin, J.C. (2000). Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760.
- Henquin, J.C., M. Gembal, P. Detimary, Z.Y. Gao, C. Warnotte und P. Gilon (1994). Multisite control of insulin release by glucose. *Diabet. Metab.* 20: 132-137.
- Henquin, J.C. (1987). Regulation of insulin release by ionic and electrical events in β -cells. *Hormone Res.* 27: 168-178.

- Henquin, J.C. und H.P. Meissner (1984). Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells. *Experientia* 40: 1043-1052.
- Holzgrabe, U. (2000). Gyrasehemstoffe im Abwind? *Pharm. Ztg.* 145: 11-16.
- Holzgrabe, U. (1999). Paradigmenwechsel in der Entwicklung antiinfektiver Chemotherapeutika. *Chemotherapie J.* 2: 69-78.
- Hooper, D.C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 31 (Suppl. 2): 24-28.
- Hopkins, W.F., J. Fatherazi, B. Peter-Reisch, B.E. Corkey und D.L. Cook (1992). Two sites for adenine-nucleotide regulation of ATP-sensitive potassium channels in mouse pancreatic beta cells and HIT cells. *J. Membr. Biol.* 129: 287-295.
- Hori, S., J. Kizu und M. Kawamura (2006). Effect of fluoroquinolones on plasma glucose levels in fasted and glucose-loaded mice. *J. Infect. Chemother.* 12: 109-111.
- Hoshino, K., A. Kitamura, I. Morrissey, K. Sato, J. Kato und H. Ikeda (1994). Comparison of inhibition of *Escherichia coli* topoisomerase IV by quinolones with DNA gyrase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2623-2627.
- Inagaki, N., T. Gonoi, J.P. Clement IV, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilar-Bryan, S. Seino und J. Bryan (1995). Reconstruction of IK_{ATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270: 1166-1170.
- Ishiwata, Y., Y. Itoga und M. Yasuhara (2006a). Effect of levofloxacin on serum glucose concentration in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 551: 168-174.
- Ishiwata, Y., Y. Sanada und M. Yasuhara (2006b). Effects of gatifloxacin on serum glucose concentration in normal and diabetic rats. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 527-531.
- Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare (1992). Report of clinical adverse reaction. No. 117 (in Japanese). *Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo*
- Johansson, H., E. Gylfe und B. Hellman (1989). Cyclic AMP raises cytoplasmic calcium in pancreatic α -cells by mobilizing calcium incorporated in response to glucose. *Cell Calcium* 10: 205-211.
- Jonas, J.C., P. Gilon und J.C. Henquin (1998). Temporal and quantitative correlations between insulin secretion and stably elevated or oscillatory cytoplasmic Ca^{2+} in mouse pancreatic β -cells. *Diabetes* 47: 1266-1273.
- Jones, P.M. und S.J. Persaud (1998). Protein kinases, protein phosphorylation and the regulation of insulin secretion from pancreatic β -cells. *Endocr. Rev.* 19: 429-461.
- Jose, J., B. Jimmy und K. Saravu (2007). Dysglycemia associated with the use of fluoroquinolones - focus on gatifloxacin. *J. Clin. Diagn. Res. (JCDR)* 1: 185-187.
- Jürgens, J., H. Schedletzky, P. Heisig, J.K. Seydel, B. Wiedemann und U. Holzgrabe (1996). Synthesis and biological activities of new N_1 -aryl substituted quinolone antibacterials. *Arch. Pharm. Med. Chem.* 329: 179-190.

- Kampranis, S.C. und A. Maxwell (1998). The DNA gyrase-quinolone complex - ATP hydrolysis and the mechanism of DNA cleavage. *J. Biol. Chem.* 273: 22615-22626.
- Kang, J., L. Wang, X.L. Chen, D.C. Triggle et al. (2001). Interactions of a series of fluoroquinolone antibacterial drugs with the human cardiac K⁺ channel HERG. *Mol. Pharmacol.* 59: 122-126.
- Kasten, F.H. (1993): Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis.* Hrsg. v. Mason, W.T. Academic Press Inc., San Diego.
- Kato, M., K. Furuhashi, M. Yoshida, K. Akahane und S. Takayama (1992). Acute oral toxicity of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin in mice, rats, and monkeys. *Drug. Res.* 42: 365-366.
- Katritsis, D. und A.J. Camm (2003). Cardioprotective or cardiotoxic? *PACE* 26: 2317-2320.
- Kendall, C. und E. Wooltorton (2006). People with diabetes should avoid antibiotic gatifloxacin. *CMAJ* 174: 1089-1090.
- Kern, W.V. (2006). Antibiotika und Chemotherapeutika. In: *Arzneimittelverordnungs-Report 2006.* Hrsg. v. Schwabe, U. und D. Paffrath. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Khovidhunkit, W. und S. Sunthornyothin (2004). Hypoglycemia, hyperglycemia, and gatifloxacin. *Ann. Intern. Med.* 141: 969.
- Khorursky, A.B. und N.R. Cozzarelli (1998). The mechanisms of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J. Biol. Chem.* 273: 27669-27677.
- Kiekens, R., M. van de Winkel, Z. Ling, P. In't Veld, F. Schuit und D. Pipeleers (1989). Glucose recognition determines functional heterogeneity in the pancreatic β -cell population. *Diabetologia* 32: 503A.
- Kinard, T.A., G. de Vries, A. Sherman und L.S. Satin (1999). Modulation of the bursting properties of single mouse pancreatic β -cells by artificial conductances. *Biophys. J.* 76: 1423-1435.
- Kingma, P. S. und N. Osheroff (1997). Apurinic sites are position-specific topoisomerase II poisons. *J. Biol. Chem.* 272: 1148-1155.
- Klecak, G., F. Urbach und H. Urwyler (1997). Fluoroquinolone antibacterials enhance UVA-induced skin tumors. *J. Photochem. Photobiol. B.* 37: 174-181.
- Komatsu, M., T. Schermerhorn, M. Noda, S.G. Straub, T. Aizawa und G.W.G. Sharp (1997). Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca²⁺: new insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 46: 1929-1938.
- Kriete, C. (2003). Wirkung von Fluorchinolonen auf die cytosolische Calciumkonzentration von B-Zellen des Pankreas. *Diplomarbeit.* Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Kucers, A. und N. McK. Bennett (1975). Nalidixic and oxolinic acids. In: *The use of antibiotics. 2nd edition. Hrsg. v. Heinemann, W. Medical Books Ltd., London, United Kingdom.*
- Lacy, P.E. und M. Kostianovsky (1967). Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.
- LeBlanc, M., C. Belanger und P. Cossette (2004). Severe and resistant hypoglycaemia associated with concomitant gatifloxacin and glyburide therapy. *Pharmacotherapy* 24: 926-931.
- Lefebvre, P.J., G. Paolisso und A.J. Scheen (1994). Magnesium and glucose metabolism. *Therapie* 49: 1-7.
- Leibiger, B., T. Moede, S. Uhles, P.O. Berggren und I.B. Leibiger (2002). Short-term regulation of insulin gene transcription. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 312-317.
- Lenzen, S. und T. Peckmann (2001). Effects of tolbutamide and N-benzoyl-D-phenylalanine (NBDP) on the regulation of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets. *Biochem. Pharmacol.* 62: 923-928.
- Lenzen, S. und U. Panten (1988). Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem. Pharmacol* 37: 371-378.
- Lenzen, S., W. Schmidt, I. Rustenbeck und U. Panten (1986). 2-Ketoglutarate generation in pancreatic B-cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids. *Biosci. Rep.* 6: 163-169.
- Lenzen, S. und U. Panten (1981). Effects of pyruvate, L-lactate, and 3-phenylpyruvate on function of ob/ob mouse pancreatic islets: insulin secretion in relation to 45 Ca^{2+} uptake and metabolism. *Biochem. Med.* 25: 366-372.
- Lernmark, A. (1974). The preparation of and studies on free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10: 431-438.
- Leshner, G.Y., E.J. Froehlich, M.D. Gruett, H.J. Bailey und R.P. Brundage (1962). 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents. *J. med. Pharm.* 5: 1063-1065.
- Levin, R. und M.S. Goldstein (1955). On the mechanism of action of insulin. *Rec. Progr. Hormone Res.* 11: 343-380.
- Lewis-Hall, F. (2006). Dear healthcare provider letter for TEQUIN[®] [gatifloxacin]. *Bristol-Meyers Squibb Company, Princeton, NJ.* Available from URL: http://www.fda.gov/medwatch/safety/2006/tequin_DHCP.pdf.
- Lewis, C., B. Howard und J. Smith (1991). Protein- and RNA-synthesis independent bactericidal activity of ciprofloxacin that involves the A subunit of DNA gyrase. *J. Med. Microbiol.* 34: 19-22.
- Li, C., C. Buettger, J. Kwagh, A. Matter, Y. Daikhin, I.B. Nissim, H.W. Collins, M. Yudkoff, C.A Stanley und F.M. Matschinsky (2004). A signaling role of glutamine in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 279: 13393-13401.
- Lillioja, S., D.M. Mott, M. Spraul et al (1993). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies in Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 329: 1988-1992.

- Lin, G., D.P. Hays und L. Spillane (2004). Refractory hypoglycaemia from ciprofloxacin and glyburide interaction. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42: 295-297.
- Liu, Y.J., H. Cheng, H. Drought, M.J. MacDonald, G.W. Sharp, S.G. Straub et al. (2003). Activation of the K_{ATP} channel-independent signaling pathway by the nonhydrolyzable analog of leucine, BCH. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 285: E380-E389.
- Liu, Y.J., A. Tengholm, E. Grapengiesser, B. Hellman und E. Gylfe (1998). Origin of slow and fast oscillations of Ca²⁺ in mouse pancreatic islets. *J. Physiol.* 508: 471-481.
- Lode, H. und E. Rubinstein (2003). Adverse effects. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.*
- MacDonald, M.J. und L.A. Fahien (2000). Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275: 34025-34027
- Maechler, P. und C.B. Wollheim (1999). Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402: 685-689.
- Maeda, N., T. Tamagawa, I. Niki, H. Miura, K. Ozawa, G. Watanabe, K. Nonogaki, K. Urmura und A. Iguchi (1996): Increase in insulin release from rat pancreatic islets by quinolone antibiotics. *Br. J. Pharmacol.* 117: 372-376.
- Makhina, E.N. und C.G. Nichols (1998). Independent trafficking of K_{ATP} channel subunits to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 273: 3369-3374.
- Malaisse, W.J., A. Sener, A. Herchuelz und J.C. Hutton (1979). Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism* 28: 373-386.
- Marians, K.J. und H. Hiasa (1997). Mechanism of quinolone action: a drug induced structural perturbation of the DNA precedes strand cleavage by topoisomerase IV. *J. Biol. Chem.* 272: 9401-9409.
- Markworth, E., C. Schwanstecher und M. Schwanstecher (2000). ATP⁴⁻ mediates closure of pancreatic β -cell ATP-sensitive potassium channels by interaction with 1 of 4 identical sites. *Diabetes* 49: 1413-1418.
- Mason, W.T., J. Hoyland, I. Davison, M.A. Carew, B. Somasundaram, R. Tregear, R. Zorec, P.M. Lledo, G. Shankar und M. Horton (1993). Quantitative real-time imaging of optical probes in living cells. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis. Hrsg. v. Mason, W.T. Academic Press Inc., San Diego.*
- Matschinsky, F.M. (1995). A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-241.
- Matschinsky, F.M. (1990). Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic β -cells and hepatocytes. *Diabetes* 39: 647-652.
- Maxwell, A. und S.E. Critchlow (1998). Mode of action. In: *Quinolone Antibacterials. Hrsg. v. Kuhlmann, J., A. Dalhoff und H.J. Zeiler. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.*

- M&B Animal Models, Data Sheet. Available from URL: <http://www.m-b.dk/Datasheets/nmri.htm>.
- Mealy, N.E. und M. Bayes (2004). Treatment of respiratory disorders. *Drugs Fut.* 30: 78-81.
- Meglasson, M.D., J. Nelson, D. Nelson und M. Erecinska (1989). Bioenergetic response of pancreatic islets to stimulation by fuel molecules. *Metabolism* 38: 1188-1195.
- Meglasson, M.D. und F.M. Matschinsky (1986). Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabet. Metab. Rev.* 2: 163-214.
- Meier, J.J. und M.A. Nauck (2005). Glucagon-like peptide (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21: 91-117.
- Meissner, H.P. und M. Preissler (1979). Glucose-induced changes in membrane potential of pancreatic B-cells: their significance for the regulation of insulin release. In: *Treatment of Early Diabetes. Hrsg. v. Camerini-Davalos, R.A. und B. Hannover. Plenum Press.*
- Meissner, H.P. (1976). Electrophysiological evidence for coupling between beta cells of pancreatic islets. *Nature* 262: 502-504.
- Meissner, H.P. und H. Schmelz (1974). Membrane potential of β -cells in pancreatic islets. *Pflügers Arch.* 351: 195-206.
- Melloul, D., S. Marshak und E. Cerasi (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 45: 309-326.
- Menzies D.J., P.A. Dorsainvil, B.A. Cunha und D.H. Johnson (2002). Severe and persistent hypoglycaemia due to gatifloxacin interaction with oral hypoglycaemic agents. *Am. J. Med.* 113: 332-334.
- Michalets, E.L. (1998). Update: clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy*. 18: 84-112.
- Miki, T., K. Nagashima, F. Tashiro, K. Kotake, H. Yoshitomi, A. Tamamoto, T. Gono, T. Iwanaga, J. Miyazaki und S. Seino (1998). Defective insulin secretion and enhanced insulin action in K_{ATP} channel deficient mice. *Proc. Natl. Sci. USA* 95: 10402-10406.
- Miller, R.E. (1981). Pancreatic neuroendocrinology: peripheral neural mechanisms in the regulation of the islets of Langerhans. *Endocrine Rev.* 2: 471-494.
- Milner, R.D. und C.N. Hales (1967). The role of calcium and magnesium in insulin secretion from rabbit pancreas studied in vitro. *Diabetologia* 3: 47-49.
- Miolo, G., G. Violo, D. Vedaldi, F. Dall'Acqua, A. Fravolini, O. Tabarrini und V. Cecchetti (2002): In vitro phototoxic properties of new 6-desfluoro-8-methylquinolones. *Toxicol. In Vitro* 16: 683-693.
- Misler, S., L.C. Falke, K. Gillis und M.L. McDaniel (1986). A metabolite-regulated potassium channel in rat pancreatic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7119-7123.

- Mitscher, L.A. (2005). Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem. Rev.* 105: 559-592.
- Mitscher, L.A. und Z. Ma (2003). Structure-activity relationships of quinolones. In: *Fluoroquinolone antibiotics*. Hrsg. v. Ronald, A.R. und D.E. Low. Birkhäuser Verlag, Basel.
- Miura, Y., J.C. Henquin und P. Gilon (1997). Emptying of intracellular Ca^{2+} -stores stimulates Ca^{2+} -entry in mouse pancreatic β -cells by both direct and indirect mechanisms. *J. Physiol.* 503.2: 387-398.
- Mizuki, Y., I. Fuyiwara und T. Yamaguchi (1996). Pharmacokinetic interactions related to the chemical structures of fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 37 (Suppl. A): 41-55.
- Mohr, J.F., P.S. McKinnon, P.J. Peymann, I. Kenton, E. Septimus und P.C. Okhuysen (2005). A retrospective, comparative evaluation of dysglycemias in hospitalized patients receiving gatifloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin, or ceftriaxone. *Pharmacotherapy* 25: 1303-1309.
- Molecular Probes (2003). Fura and Indo ratiometric calcium indicators. *Product information MP 01200*: 1-6.
- Molleman, A. (2003). Patch clamping: an introductory guide to patch clamp electrophysiology. Willey, Chichester.
- Montero, M.T. und J. Hernández-Borrell (1994). Fluoroquinolone distribution in a phospholipid environment studied by spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 290: 58-64.
- Murphy, E. (1993). Measurement of intracellular ionized magnesium. *Miner. Electrolyte Metab.* 19: 250-258.
- Musch, A. und S. Heinzl (2006). Exenatid - Inkretin-Mimetikum zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2. *Med. Monatsschr. Pharm.* 29: 86-89.
- Naber, K.G. und D. Adam (1998). Einteilung der Fluorchinolone. *Mün. Med. Wschr.* 140: 248-250.
- Nadal, A., I. Quesada und B. Soria (1999). Homologous and heterologous asynchronicity between identified α -, β - and γ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J. Physiol.* 517: 85-93.
- Nadal, A., M. Valdeolmillos und B. Soria (1994). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes induced by tolbutamid in single pancreatic islets. In: *Insulin secretion and pancreatic b-cell research*. Hrsg. v. Flatt, P.R. und S. Lenzen. Smith-Gordon and Company Limited, London.
- Nagamatsu, S., T. Watanabe, Y. Nakamichi, C. Yamamura, K. Tsuzuki und S. Matsushima (1999). α -Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein is expressed in pancreatic β cells and functions in insulin but not γ -aminobutyric acid secretion. *J. Biol. Chem.* 274: 8053-8060.
- Neher, E. und B. Sakmann (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802.
- Nenquin, M., A. Szollosi, L. Aguilar-Bryan, J. Bryan und J.C. Henquin (2004). Both triggering and amplifying pathways contribute to fuel-induced insulin

- secretion on the absence of sulfonylurea receptor-1 in pancreatic β -cells. *J. Biol. Chem.* 279: 32316-32324.
- Neu, H.C. (1994). Major advances in antibacterial quinolone therapy. *Adv. Pharmacol.* 29: 227-262.
- Neves, P., A. Leite, M. Rangel, B. de Castro und P. Gameiro (2007). Influence of structural factors on the enhanced activity of moxifloxacin: a fluorescence and EPR spectroscopic study. *Anal. Bioanal. Chem.* 387: 1543-1552.
- Nichols, C.G. und A.N. Lopatin (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 171-191.
- Norrby, S.R. (2003). Central nervous system toxicity. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. American Society of Microbiology (ASM) Press, Washington, DC.*
- Norrby, S.R. und P.S. Lietman (1993). Temafloxacin. *Drugs* 45 (Suppl. 3): 59-64.
- Orci, L. (1976). Morphofunctional aspects of the islet of Langerhans: the microanatomy of the islets of Langerhans. *Metabolism* 25 (Suppl. 1): 1303-1313.
- Orci, L., F. Malaisse-Lagae, M. Ravazolla, D. Rouiller, A.E. Renold, A. Perrelet und R. Unger (1975). A morphological basis for intercellular communication between α - and β -cells in the endocrine pancreas. *J. Clin. Invest.* 56: 1066-1070.
- Oka, Y., T. Asano, H. Katagiri, J.I. Miyazaki, K. Tsukada, H. Ishihara und M. Kikuchi (1994). Characteristics of the GLUT-2 glucose transporter in pancreatic B-cells. In: *Frontiers of insulin secretion and pancreatic b-cell research. Hrsg. v. Flatt, P. und S. Lenzen. Smith-Gordon and Company Limited, London.*
- Okezaki, E., T. Terasaki, M. Nakamura et al. (1989). Serum protein binding of lomefloxacin, a new antimicrobial agent, and its related quinolones. *J. Pharm. Sci.* 78: 504-507.
- Ovartlarnporn, M. und W. Jongjaroenprasert (2007). Advancing age and renal impairment as important predisposing factors of gatifloxacin-induced hyperglycemia in non-diabetes patients. *J. Med. Ass. Thailand* 90: 569-573.
- Owens, R.C. Jr. (2005). Fluoroquinolone-associated dysglycemias: a tale of two toxicities. *Pharmacotherapy* 25: 1291-1295.
- Owens, R.C. Jr. und P.G. Ambrose (2005). Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones. *Clin. Inf. Dis.* 41 (Suppl. 2): 144-157.
- Panten, U., C. Heipel, F. Rosenberger, K. Scheffer, B.J. Zünkler und C. Schwanstecher (1990). Tolbutamide-sensitivity of the adenosine-5'-triphosphate-dependent K^+ channel in mouse pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 566-574.
- Panten, U., M. Schwanstecher, A. Wallasch und S. Lenzen (1988): Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338: 459-462.
- Panten, U. (1975). Effects of alpha-ketomonocarboxylic acids upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 291: 405-420.

- Paolisso, G., A. Scheen, F. D'Onofrio und P. Lefebvre (1990). Magnesium and glucose homeostasis. *Diabetologia* 33:511-514.
- Park-Wyllie, L.Y., D.N. Juurlink, A. Kopp, B.J. Shad, T.A. Stukel, C. Stumpo, L. Dresser, D.E. Low und M.M. Mamdani (2006). Outpatient gatifloxacin therapy and dysglycemia in older adults. *N. Engl. J. Med.* 354: 1352-1361.
- Patterson, G.H., S.M. Knobel, P. Arkhammar, O. Thastrup und D.W. Piston (2000). Separation of the glucose-stimulated cytoplasmic and mitochondrial NAD(P)H responses in pancreatic islet β cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 5203-5207.
- Petersen, U. (2001). Von der Nalidixinsäure zu den Chinolonen der dritten Generation. *Pharm. Unserer Zeit* 30: 376-381.
- Peterson, L.R., L.M. Lissack, K. Canter, C.E. Fasching, C. Clabots und D.N. Gerding (1989). Therapy of lower extremity infections with ciprofloxacin in patients with diabetes mellitus, peripheral vascular disease, or both. *Am. J. Med.* 86: 801-808.
- Pipeleers, D.G. (1987). The biosociology of the pancreatic b-cell. *Diabetologia* 30: 277-291.
- Pipeleers, D.G., F. Schuit, P.A. In't Veld, E. Maes, E.L. Hooghe-Peters, M. van de Winkel und W. Gepts (1985). Interplay of nutrients and hormones in the regulation of insulin release. *Endocrinology* 117: 824-833.
- Pietrobon, D., F. di Virgilio und T. Pozzan (1990). Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 193: 599-622.
- Pflöger, A. (2006). Wirkung von Fluorchinolonen auf die Insulinsekretion von isolierten, umströmten Pankreasinseln der Maus. *Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg.*
- Plant, T.D. (1988). Properties and calcium-dependent inactivation in cultured mouse pancreatic B-cells. *J. Physiol.* 404: 731-747.
- Ploem, J.S. (1993). Fluorescence microscopy. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis.* Hrsg. v. Mason, W.T.. Academic press, San Diego.
- Porte, D. Jr. (2006). Central regulation of insulin homeostasis. The key role of insulin. *Diabetes* 55 (Suppl. 2): S155-S160.
- Porte, D. Jr., D.G. Baskin und M.W. Schwartz MW (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr. Rev.* 60: S20 –S29.
- Porte, D. Jr. und S.C. Woods (1981). Regulation of food intake and body weight. *Diabetologia* 20 (Suppl. 1): 274–280.
- Postow, L., N.J. Crisona, B.J. Peter, C.D. Hardy und N.R. Cozzanelli (2001). Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. *Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8219-8226.
- Pralong, W.F., C. Bartley, und C.B. Wollheim (1990). Single islet beta-cell stimulation by nutrients: Relationship between pyridine nucleotides, cytosolic Ca^{2+} and secretion. *EMBO J.* 9: 53-60.

- Prentki, M. und F.M. Matschinsky (1987). Ca^{2+} , cAMP and hypoglycaemia-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67:1185.
- Prentki, M. (1996). New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur. J. Endocrinol.* 134: 272-286.
- Proks, P. und F. Ashcroft (1997). Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 11716-11720.
- Quesada, I., A. Nadal und B. Soria (1999). Different effects of tolbutamide and diazoxide in α -, β - and δ -cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48: 2390-2397.
- Randle, P.J., S.J.H. Ashcroft und J.R. Gill (1968). Carbohydrate metabolism and the release of hormones. In: *Carbohydrate metabolism and its disorders* 1:427-437.
- Reinhart, R.A. (1988). Magnesium metabolism. A review with special reference to the relationship between intracellular content and serum levels. *Arch. Intern. Med.* 148: 2415-2420.
- Riedy, C.A., M. Chavez, D.P. Figlewicz und S.C. Woods (1995). Central insulin enhances sensitivity to cholecystokinin. *Physiol. Behav.* 58: 755-760.
- Rieutord, A., L. Vazquez, M. Soursac, P. Prognon, J. Blais, Ph. Bourget und G. Mahuzier (1994). Fluoroquinolones as sensitizers of lanthanide fluorescence: application to the liquid chromatographic determination of ciprofloxacin using terbium. *Anal. Chim. Acta* 290: 219-225.
- Riley, C.M., D.L. Ross, D. van der Velde und F. Takusagwa (1993). Characterization of the complexation of fluoroquinolone antimicrobials with metal ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11: 49-59.
- Roberge, R.J., R. Kaplan, P. Frank und C. Fore (2000): Glyburide-ciprofloxacin interaction with resistant hypoglycaemia. *Ann. Emerg. Med.* 36: 160-163.
- Rolain, J.M. und D. Raoult (2003). Treatment of intracellular infections. In: *Quinolone antimicrobial agents. 3rd Edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. ASM Press, Washington, DC.*
- Rorsman, P. und E. Renström (1999). Glutamate primes the pump. *Nature* 402: 595-596.
- Rorsman, P. (1997). The pancreatic beta-cell as a fuel sensor: an electrophysiologist's viewpoint. *Diabetologia* 40: 487-495.
- Rorsman, P., P.O. Berggren, K. Bokvist et al. (1989). Glucose-inhibition of glucagon secretion involves activation of GABA_A receptor chloride channels. *Nature* 341: 233-236.
- Rorsman, P. und G. Trube (1986). Calcium and delayed potassium currents in mouse pancreatic beta-cells under voltage-clamp conditions. *J. Physiol.* 374: 531-550.
- Rosen, T., D.T.W. Chu, I.M. Lico, P.B. Fernandez, L. Shen, S. Borodkin und A.G. Pernet (1988). Asymmetric synthesis and properties of the enantiomers of the antibacterial agent 7-(3-aminopyrrolidin-1-yl)-1-(2,4-difluorophenyl)-1,4-di-

- hydro-6-fluoro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid hydrochloride. *J. Med. Chem.* 31: 1586-1590.
- Ross, D.L. und C.M. Riley (1994). Dissociation and complexation of the fluoroquinolone antimicrobials - an update. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 12: 1325-1331.
- Ross, D.L., S.K. Elkinton, S.R. Knaup und C.M. Riley (1993). Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. VI: Effect of metal-ion complexation on octan-1-ol-water-partitioning. *Int. J. Pharm.* 93: 131-138.
- Ross, D.L. und C.M. Riley (1992). Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. III. Complexation of lomefloxacin with various metal ions and the effect of metal ion complexation on aqueous solubility. *Int. J. Pharm.* 87: 203-218.
- Rubinstein, E. (2001). History of quinolones and their side effects. *Chemotherapy* 47 (Suppl. 3): 3-8.
- Rustenbeck, I., A. Wienbergen, C. Bleck und A. Jörns (2004). Desensitization of insulin secretion by depolarizing insulin secretagogues. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S140-S150.
- Rustenbeck, I. (1999). Die Stimulus-Sekretions-Kopplung in den B-Zellen des Pankreas: Von der Physiologie zur Pharmakologie. *Diabetes und Stoffwechsel* 8: 217-222.
- Rustenbeck, I., C. Herrmann, P. Ratzka und A. Hasselblatt (1997). Imidazoline/guanidinium binding sites, and their relation to inhibition of K_{ATP} channels in pancreatic B-cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356: 410-417.
- Şahin, S. (2007). Untersuchungen zur glucoseabhängigen Wirkung der Fluorchinolone Gatifloxacin, Moxifloxacin und Ciprofloxacin auf isolierte, umströmte Pankreasinseln. *Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Sakai, M., A. Hara, S. Anjo und M. Nakamura (1999). Comparison of the complexation of fluoroquinolone antimicrobials with metals ions by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18: 1057-1067.
- Sakurai, I., M. Yoshida, Y. Ishida, F. Matsumoto, T. Takahashi, M. Morita et al. (1996). The influence of new quinolones on blood glucose level. *Jpn. J. Chemother.* 44: 798-803.
- Sanguinetti, M.C., C. Jiang, M.E. Curran und M.T. Keating (1995). A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* 81:299-307.
- Santos, R.M., L.M. Rosário, A. Nadal, J. Garcia Sancho, B. Soria und M. Valdeolmillos (1991). Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflügers Arch.* 418: 417-422.
- Saraya, A. M. Yokokura, T. Gonoï und S. Seino (2004). Effects of fluoroquinolones on insulin secretion and β -cell ATP-sensitive K^+ -channel. *Eur. J. Pharmacol.* 497: 111-117.
- Satin, L.S. und D.L. Cook (1989). Calcium current inactivation in insulin-secreting cells is mediated by calcium influx and membrane depolarization. *Pflügers Arch.* 414: 1-10

- Satin, L.S. und P.D. Smolen (1994). Electrical bursting in β -cells of the pancreatic islets of Langerhans. *Endocrine* 2: 677-687.
- Satoh, Y., A. Sugiyama, K. Chiba K. Tamura und K. Hoshimoto (2000). QT-prolonging effects of sparfloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, assessed in the in vivo canine model with monophasic action potential monitoring. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36: 510-515.
- Schaumann, R. und A.C. Rodloff (2007). Activities of quinolones against obligately anaerobic bacteria. *Anti-Infect. Agents in Med. Chem.* 6: 49-56.
- Schmitz, F.J., P.G. Higgins, S. Mayer, A.C. Fluit und A. Dalhoff (2002). Activity of quinolones against gram-positive cocci: mechanisms of drug action and bacterial resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 647-659.
- Schuit, F.C. und D.G. Pipeleers (1986). Differences in adrenergic recognition by pancreatic A- and B-cells. *Science* 232: 875-877.
- Schwartz, M.W., R.L. Prigeon, S.E. Kahn, M. Nicholson, J. Moore, A. Morawiecki, E.J. Boyko und D. Jr. Porte (1997). Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care* 20: 1476-1481.
- Seghers, V., M. Nakazaki, F. DeMayo, L. Aguilar-Bryan und J. Bryan (2000). Sur1 knockout mice. A model for K_{ATP} channel-independent regulation of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 275: 9270-9277.
- Shad, P.M. (2001). Indikationen aus klinisch-mikrobiologischer Sicht: Wann sollte man Chinolone einsetzen. *Pharm. Unserer Zeit* 30: 394-398.
- Shailer, P.A., E. Randinitis, G. Rausch, A. Sedman und A. Vassos (1997). Effect of clinafloxacin on serum insulin and glucose levels healthy subjects. *Clin. Pharm. Ther.* 61: 148.
- Shakibaei, M., I. Baumann-Wilschke, M. Rücker und R. Stahlmann (2002). Ultrastructural characterization of murine limb buds after exposure to grepafloxacin and other fluoroquinolones. *Arch. Toxicol.* 75: 725-733.
- Shiota, C., O. Larsson, K.D. Shelton, M. Shiota, A.M. Efanov, M. Hoy, J. Lindner, S. Kooptiwut, L. Juntti-Berggren, J. Gromada, P.O. Berggren und M.A. Magnuson (2002). Sulfonylurea receptor type 1 knock-out mice have intact feeding-stimulated insulin secretion despite marked impairment in their response to glucose. *J. Biol. Chem.* 277: 37176-37183.
- Shimada, J., K. Shiba, T. Oguma, H. Miwa, Y. Yoshimura, T. Nishikawa, Y. Okabayashi, T. Kitagawa und S. Yamamoto (1992). Effect of antacid on absorption of the quinolone lomefloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1219-1224.
- Simpson, A.W. (1999). Fluorescent measurement of $[Ca^{2+}]_i$: Basic practical considerations. In: *Calcium Signaling Protocols*. Hrsg. v. Lambert, D.G. Humana Press, Totowa (New Jersey).
- Smith, K.M. und B.M. Lomaestro (2003). What role do fluoroquinolone antimicrobial agents play in cardiac dysfunction and altered glycemic control? *J. Pharmacy Practice* 16: 349-360.

- Smith, J.T. (1986). The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 18: 21-29.
- Snyper, M. und K. Drlica (1979). DNA on the bacterial chromosome: DNA cleavage induced by oxolinic acid. *J. Mol. Biol.* 131: 287-302.
- Sollner, T., M.K. Bennett, S.W. Whiteheart, R.H. Scheller und J.E. Rothman (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-418.
- Solomkin, J.S., S.E. Wilson, R.S. Bennion et al. (1998). Results of a prospective blinded RCT comparing clinafloxacin (CLX) to imipenem/cilastatin for complicated intra-abdominal infections [abstract MN-55]. *Program and abstract of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego (CA)*.
- Song, G., Q. Yan und Y. He (2005). Studies on Interaction of Norfloxacin, Cu²⁺, and DNA by Spectral Methods. *J. Fluorescence* 15: 673-678.
- Stahlmann, R. (2002). Clinical toxicological aspects of fluoroquinolones. *Toxicol. Lett.* 127: 269-277.
- Stahlmann, R. und D. Höffler, (2000). Unerwünschte Wirkungen und Risiken von Fluorchinolonen. *Deutsches Ärzteblatt* 97: A3022-A3026.
- Stahlmann, R. und H. Lode (1999). Toxicity of quinolones. *Drugs* 58 (Suppl. 2): 37-42.
- Stahlmann, R. und H. Lode (1998). Concentration-effect relationship of the fluoroquinolones. In: *Quinolone Antibacterials*. Hrsg. v. Kuhlmann, J., A. Dalhoff und H.J. Zeiler. Springer Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Stahlmann, R. und Riecke (2001). Unerwünschte Wirkungen der Chinolone. *Pharm. Unserer Zeit* 30: 412-417.
- Stefani, S. (2005). Emergence of multidrug-resistant gram-positive bacteria and new active antibiotics. *Curr. Med. Chem. Anti-Infective Agents* 4: 235-257.
- Stewart, J.J.P. (1989). Optimizing of parameters for semiempirical methods II. Applications. *J. Comp. Chem.* 10: 221-264.
- Suda, M., T. Minami, H. Aono, T. Koh, Y. Hamada und M. Yashiro (2000). Repeated hypoglycemia induced by lomefloxacin in chronic renal failure on hemodialysis. *J. Kyoto City Hosp.* 20: 41-46.
- Sugino, A., C.L. Peebles, K.N. Kruezer und N.R. Cozzarelli (1977). Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 4767-4771.
- Suárez, A., N. Pulido, A. Casla, B. Casanova, F.J. Arrieta und A. Rovira (1995). Impaired tyrosinekinase activity of muscle insulin receptors from hypomagnesaemic rats. *Diabetologia* 38: 1262-1270.
- Takahashi, A., P. Camacho, J.D. Lechleiter und B. Herman (1999). Measurement of intracellular calcium. *Physiol. Rev.* 79: 1089-1125.

- Takehiro, M., K. Kurose, S. Fujimoto, K. Nagashima, Y. Seino, K. Nakamura et al. (2002). Severe hypoglycaemia induced by lomefloxacin hydrochloride in a hemodialytic patient. *J. Jpn. Diabet. Soc.* 45: 293.
- Talan, D.A. (2001). Clinical Perspectives on new antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin. Inf. Dis.* 32 (Suppl 1): S64–S71.
- Taniguchi, H., Y. Okada, H. Seguchi, C. Shimada, M. Seki, A. Tsutou und S. Baba (1979). High concentration of γ -aminobutyric acid in pancreatic β -cells. *Diabetes* 28: 629-633.
- Tashiro, M., C.I. Spencer und J.R. Berlin (2002). Modulation of cardiac excitation-contraction coupling by cytosolic $[Mg^{2+}]$. *Biophys J.* 82: 352.
- Tomita, T., M. Onishi, E. Sato, Y. Kimura und K. Kihira (2007). Gatifloxacin induces augmented insulin release and intracellular insulin depletion of pancreatic islet cells. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 644-647.
- Tsien, R.Y., T. Pozzan und T.J. Ring (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* 94: 325-334.
- Tsuji, A., H. Sato, Y. Kume, I. Tamai, E. Okezaki, O. Nagata und H. Kato (1988). Inhibitory effects of quinolone antibacterial agents on γ -aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat brain membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 190-194.
- Tucker, S.J., F.M. Gribble, C. Zhao, S. Trapp und F.M. Ashcroft (1997). Truncation of $K_{ir}6.2$ produces ATP-sensitive K^+ -channels in the absence of sulphonylurea receptor. *Nature* 387: 179-183.
- Turner, R.C., E. Harris, E. Ounsted und C. Ponsford (1979). Two abnormalities of glucose-induced insulin secretion: Dose response characteristics and insulin sensitivity. *Acta Endocrinol.* 92: 148-165.
- Ueda, K., J. Komine, M. Matsuo, S. Seino und T. Amachi (1999). Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1268-1272.
- Unger, R.H. und A.M. Eisentraut (1969). Entero-insular axis. *Arch. Intern. Med.* 123: 261-266.
- Valdeolmillos, M., A. Nadal, B. Soria und J. Garchia-Sancho (1993). Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42: 1210-1214.
- van Bambeke, F., J.M. Michot, J. van Eldere und P.M. Tulkens (2005). Quinolones in 2005: an update. *Clin. Microbiol. Infect.* 11: 256-280.
- von Blankenfeld, G., J. Turner, G. Ahnert-Hilger et al (1995). Expression of functional GABA_A receptors in neuroendocrine gastropancreatic cells. *Pflügers Arch.* 430: 381–388.
- von Keutz, E. und W. Christ (1998). Toxicology and safety pharmacology of quinolones. In: *Quinolone antibacterials*. Hrsg. v. Kuhlmann, J., A. Dalhoff und H.J. Zeiler. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.

- Wacke, R., S. Förster, U. Adam, R.G. Mundkowski, E. Klar, U.T. Hopt und B. Drewelow (2006). Penetration of moxifloxacin into the human pancreas following a single intravenous or oral dose. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 994-999.
- Wang, S. und A.A. Rizvi (2006). Levofloxacin-induced hypoglycaemia in a nondiabetic patient. *Am. J. Med. Sci.* 331: 334-335
- Welling, L. und C.L. Burke (1999). Safety of cinafloxacin, a new fluoroquinolone antibiotic. In: *Program and abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA. American Society for Microbiology, Washington, DC.*
- Whitely, M., J. Worliding, S. Patel et al (1993). Hypoglycaemia in a diabetic patient, associated with ciprofloxacin therapy. *Pract. Diabetes* 10: 35.
- WHO (2006a). Medicines for tuberculosis. *WHO Drug Inf.* 20: 239-240.
- WHO (2006b). Clinical trials of Gatifloxacin: shorter tuberculosis treatment regime. *WHO Drug Inf.* 20: 11.
- WHO (2006c). Gatifloxacin and blood glucose disturbances. *WHO Drug Inf.* 20: 72.
- Wienbergen, A., C. Bleck, T. Grosse Lackmann und I. Rustenbeck (2007). Antagonism of the insulinotropic action of first generation imidazolines by openers of K_{ATP} channels. *Biochem. Pharmacol.* 73: 94-102.
- Wollheim, C.B. und G.W.G. Sharp (1981). Regulation of insulin release by calcium. *Physiol. Rev.* 61: 914-973.
- Yada, T. (1994). Action mechanisms of amino acids in pancreatic B-cells. In: *Frontiers of insulin secretion and pancreatic b-cell research. Hrsg. v. Flatt, P. und S. Lenzen. Smith-Gordon and Company Limited, London.*
- Yamada, C., K. Nagashima, A. Takahashi, H. Ueno, Y. Kawasaki, Y. Yamada, Y. Seino und N. Inagaki (2006). Gatifloxacin acutely stimulates insulin secretion and chronically suppresses insulin biosynthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 553: 67-72.
- Yamaguchi, H., H. Kawai, T. Matsumoto, H. Yokoyama, T. Nakayasu, M. Komiya und J. Shimada (2007). Post-marketing surveillance of the safety of levofloxacin in Japan. *Chemotherapy* 53: 85-103.
- Yap, Y.G., und A.J. Camm (2003). QT prolongation with quinolone antibacterial agents. In: *Quinolone antibacterial agents. 3rd edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. ASM Press, Washington, DC.*
- Yew, W.W., C.K. Chan, C.C. Leung et al. (2003). Comparative roles of levofloxacin and ofloxacin in the treatment of multidrug resistant tuberculosis: preliminary results of a retrospective study from Hong Kong. *Chest.* 124: 1476-1481.
- Yip, C. und A.J. Lee (2006). Gatifloxacin-induced hyperglycemia: a case report and summary of the current literature. *Clin. Ther.* 28: 1857-1866.
- Young, L.S. (2003). Effects of quinolones on the immune system. In: *Quinolone antibacterial agents. 3rd edition. Hrsg. v. Hooper, D.C. und E. Rubinstein. ASM Press, Washington, DC.*

-
- Zerangue N., B. Schwappach, Y.N. Jan und L.Y. Jan (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22: 537-548.
- Zhang, Y. (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacolo. Toxicol.* 45: 529-564.
- Zhanel, G.G. und A.M. Noreddin (2001). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 459–463.
- Zimny, S., F. Goglin, J. Abel, H. Gleichmann (1993). Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch. Toxicol.* 67: 61-65.
- Zünkler, B.J., S. Claassen, M. Wos-Maganga, I. Rustenbeck und U. Holzgrabe (2006). Effects of fluoroquinolones on HERG channels and on pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channels. *Toxicol.* 228: 239-248.
- Zünkler, B.J. und M. Wos (2003). Effects of lomefloxacin and norfloxacin on pancreatic beta-cell ATP-sensitive K(+) channels. *Life Sci.* 73: 429-435.

